

CÍNTIA DELAI DA SILVA

***Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae) – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIINFLAMATÓRIA TÓPICA EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO DE PELE  
AGUDO E CRÔNICO EM CAMUNDONGOS**

Curitiba  
2009

CÍNTIA DELAI DA SILVA

***Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae) – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIINFLAMATÓRIA TÓPICA EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO DE PELE  
AGUDO E CRÔNICO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação desenvolvida no Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná durante o Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela Cabrini de Almeida

Co-Orientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki


Curitiba  
2009

## PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado "COMBRETUM LEPROSUM MART. & EICHER (COMBRETACEAE) – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO DE PELE AGUDO E CRÔNICO EM CAMUNDONGOS", de autoria da pós-graduanda: **CÍNTIA DELAI DA SILVA**, sob a orientação da Profª Drª Daniela de Almeida Cabrini e composta pelos professores: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki (Co-orientador-UEPG - UFPR); Prof. Dr. Octávio Menezes de Lima Júnior (Fundação Oswaldo Cruz - RJ); Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio (Farmacologia – UFPR); Dra. Maria Fernanda de Paula Werner (suplente - UFSC). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a Pós-Graduanda foi Aprovada. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pela sua orientadora. Em Curitiba, 10 de fevereiro de 2009.



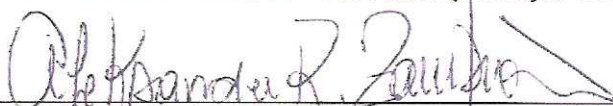
Profª Drª. Daniela de Almeida Cabrini (Presidente-Orientadora-UFPR)



Prof. Dr. Michel Fleith Otuki (Co-Orientador- UEPG-UFPR)




Prof. Dr. Octávio Menezes de Lima Júnior (Fundação Oswaldo Cruz - RJ)



Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio (Depto de Farmacologia - UFPR)


1  
2 **ATA DO JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

3 Ao décimo dia do mês de fevereiro do ano de dois mil e nove, às treze e trinta  
4 horas, Anfiteatro nº 10 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná,  
5 reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado de autoria da Pós-  
6 Graduanda em Farmacologia, **CÍNTIA DELAI DA SILVA**, intitulada: : "COMBRETUM  
7 LEPROSUM MART. & EICHER (COMBRETACEAE) – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-  
8 INFLAMATÓRIA TÓPICA EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO DE PELE AGUDO E  
9 CRÔNICO EM CAMUNDONGOS", sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela de Almeida  
10 Cabrini e composta pelos professores: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki (Co-orientador-UEPG  
11 - UFPR); Prof. Dr. Octávio Menezes de Lima Júnior (Fundação Oswaldo Cruz - RJ); Prof.  
12 Dr. Aleksander Roberto Zampronio (Farmacologia – UFPR); Dra. Maria Fernanda de Paula  
13 Werner (suplente - UFSC). A Banca Examinadora iniciou os trabalhos. A candidata teve  
14 quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho, sendo em seguida argüida  
15 durante quinze minutos por cada um dos membros da Banca, e tendo trinta minutos para  
16 responder a cada uma das arguições. No final a Comissão Examinadora emitiu o seguinte  
17 parecer: Aprovado. De acordo com o Regimento Interno do Programa  
18 de Pós-Graduação em Farmacologia, a Pós-Graduanda foi aprovada. Para a publicação o  
19 trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas por sua orientadora.  
20 Nada mais havendo a tratar, a Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a  
21 presente ata, que será assinada pela Presidente e pelos demais Membros da Banca  
22 Examinadora, em Curitiba, 10 de fevereiro de 2009.  
23  
24  
25

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Daniela de Almeida Cabrini (Presidente-Orientadora-UFPR)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Michel Fleith Otuki (Co-Orientador- UEPG-UFPR)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Octávio Menezes de Lima Júnior (Fundação Oswaldo Cruz - RJ)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio ( Depto de Farmacologia - UFPR)

*A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.*

*Albert Einstein*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, o autor da vida, por ser presença constante em meus dias apresentando-me oportunidades maravilhosas. Obrigada Senhor por guiar meus passos sustentando-me nas horas de cansaço e desânimo.

Aos meus pais, Elizeu e Amália, e aos meus irmãos, Bruno e Débora, por estarem sempre me esperando com abraços repletos de amor, compreensão e tranquilidade. Obrigada por acreditarem em meu potencial e me apoiar na busca da realização de meus sonhos.

Ao meu amado Frank, que com sua enorme paciência e muito amor, esteve sempre ao meu lado tornando menores os obstáculos encontrados. Obrigada por acreditar nas minhas convicções, incentivá-las e principalmente por fazer da volta pra casa o momento mais esperado e especial do dia.

Aos meus colegas de laboratório e de mestrado, por tornarem os dias mais leves e o trabalho mais prazeroso. Especialmente aqueles que conseguiram tornar-se muito mais que colegas: Alliete, Ana Clara, Daniel, Evelise e Laryssa vocês foram peças fundamentais para o sucesso dessa jornada. Obrigada pelo carinho e cumplicidade.

Aos meus orientadores e amigos Daniela Cabrini e Michel Otuki, que com competência e entusiasmo ensinaram-me os melhores caminhos a se trilhar na busca do conhecimento e do sucesso. Obrigada pela dedicação e atenção.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse projeto.

## RESUMO

*Combretum leprosum* (Combretaceae), arbusto popularmente conhecido como “mofumbo”, é utilizado na medicina popular na cicatrização de feridas, no tratamento de hemorragias e como sedativo. Estudos realizados com o extrato bruto e com compostos isolados atribuem atividade analgésica à *Combretum leprosum*. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antiinflamatória tópica do extrato e de um composto isolado dessa espécie. A atividade do extrato etanólico das flores de *C. leprosum* (EE) e do triterpeno isolado, 3 $\beta$ ,6 $\beta$ ,16 $\beta$ -trihidroxilup-20(29)-eno (TTHL) foi avaliada nos modelos de edema de orelha induzido por 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA), ácido araquidônico (AA), fenol e aplicação repetida de óleo de cróton (OC), em camundongos Swiss fêmeas (20-30 g; N=5-10). A aplicação tópica do EE inibiu o edema provocado por TPA [DI<sub>50</sub>= 0,11 (0,13-0,10) mg/orelha e I<sub>max</sub>= 96  $\pm$  2%], AA (I<sub>max</sub>= 72  $\pm$  2%) e fenol (I<sub>max</sub>= 82  $\pm$  3%) e ainda a atividade da mieloperoxidase (MPO) [DI<sub>50</sub>= 0,13 (0,16-0,11) mg/orelha e I<sub>max</sub>= 86  $\pm$  3%] no modelo de TPA. O TTHL reduziu o edema causado pela aplicação tópica de TPA com DI<sub>50</sub>= 0,15 (0,08-0,21) mg/orelha e I<sub>max</sub>= 97  $\pm$  1% e também inibiu o aumento da atividade da enzima MPO com I<sub>max</sub>= 90  $\pm$  1%. Nesse mesmo modelo, tanto o extrato quanto o composto reduziram a migração leucocitária em 63  $\pm$  2% conforme evidenciado por análise histológica. O EE demonstrou efeito anti-edematogênico duradouro de até doze horas quando aplicado topicamente. Quando o EE foi administrado por via oral causou inibição de apenas 18  $\pm$  8%. O EE foi ainda capaz de alterar os parâmetros inflamatórios no modelo de inflamação crônica (aplicação repetida de OC) inibindo o edema em 66  $\pm$  5% e em 40  $\pm$  3% a hiperproliferação epidérmica, em 33  $\pm$  2% a infiltração de leucócitos e em 29  $\pm$  8% a atividade da enzima n-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG). Ainda nesse modelo, o EE foi capaz de inibir o aumento da expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), um marcador de células proliferativas, nas células epidérmicas em 16  $\pm$  7%. Os resultados obtidos sugerem que o EE e o composto TTHL possuem potente atividade antiinflamatória por via tópica, visto que foram capazes de inibir o edema e a migração celular em processos inflamatórios na pele. Entretanto, mais investigações se fazem necessárias acerca da atividade do EE assim como do TTHL e outros compostos isolados.

**Palavras-chave:** *Combretum leprosum*; TTHL; inflamação; pele; hiperproliferação epidérmica.



## ABSTRACT

*Combretum leprosum* (Combretaceae) is a shrub popularly known as "mofumbo", used in folk medicine as a wound healer, in the treatment of haemorrhages or as a sedative. A study conducted with the crude extract from flowers and isolated compounds as triterpenes described an analgesic activity to *Combretum leprosum*. The aim of this study was to evaluate the topical anti-inflammatory activity of the ethanolic extract (EE) and the isolated triterpene from the flowers of *C. leprosum*. The topical anti-inflammatory activity of the extract was evaluated using the mice ear edema model induced by 12-O-tetradecanoilforbol acetate (TPA), arachidonic acid (AA), phenol and repeated application croton oil (CO), using female Swiss mice (20-30 g). The topical application of EE caused an inhibition of ear edema induced by TPA [ $DI_{50}$ = 0.11 (0.13-0.10) mg/ear and  $I_{max}$ =  $96 \pm 2\%$ ], AA ( $I_{max}$ =  $72 \pm 2\%$ ) and phenol ( $I_{max}$ =  $82 \pm 3\%$ ), and the extract even decrease the myeloperoxidase (MPO) activity [ $DI_{50}$ = 0.13 (0.16-0.11) mg/ear and  $I_{max}$ =  $86 \pm 3\%$ ] in the TPA model. TTHL was able to reduce the TPA-induced ear edema showing  $DI_{50}$ = 0.15 (0.08-0.21) mg/ear and  $I_{max}$ =  $97 \pm 1\%$  and the MPO activity with  $I_{max}$ =  $90 \pm 1\%$ . The histological analyses showed that both extract and compound reduced cellular migration ( $63 \pm 2\%$ ) and edema. EE presented at least 12 hours duration for the anti-edematogenic effect when topically applied. However, the oral treatment with EE caused a small reduction in the TPA-induced ear edema ( $18 \pm 8\%$ ). The extract was also able to change the inflammatory parameters in the chronic inflammation model (CO repeated applications), with  $66 \pm 5\%$  of edema inhibition and  $40 \pm 3\%$  inhibition of epidermal hyperproliferation,  $33 \pm 2\%$  inhibition of cellular influx and  $29 \pm 8\%$  of n-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) activity. Also in this model, EE was able to inhibit in  $16 \pm 7\%$  the increase in the expression of the Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), a marker of proliferative cells, in the epidermal cells. These results suggest that the EE and TTHL present a potent topical anti-inflammatory action, since they were able to inhibit the edema formation and cellular migration in skin inflammatory process. However, further investigation concerning EE and isolated compounds anti-inflammatory activity are necessary.

**Key words:** *Combretum leprosum*; TTHL; inflammation; skin; epidermal hyperproliferation.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. Pele e Processo Inflamatório.....	2
1.2. Uso de Plantas Medicinais .....	9
1.3. <i>Combretum</i> – O Gênero .....	12
1.4. <i>Combretum leprosum</i> .....	13
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
2.1. Objetivos Gerais .....	18
2.2. Objetivos Específicos .....	18
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
3.1. Material Botânico .....	20
3.2. Obtenção do Extrato Etanólico e Isolamento, Purificação e Identificação Química dos Compostos .....	20
3.3. Animais e Manutenção .....	21
3.4. Drogas e Reagentes .....	21
3.5. Modelo de Edema de Orelha .....	22
3.5.1. Avaliação do Edema .....	22
3.5.2. Avaliação do Edema Induzido pela Aplicação Tópica de TPA ...	22
3.5.3. Avaliação do Edema de Orelha Induzido pela Aplicação Tópica de Ácido Araquidônico .....	23
3.5.4. Avaliação do Edema de Orelha Induzido pela Aplicação Tópica de Fenol .....	23
3.5.5. Edema de Orelha Induzido pela Aplicação Múltipla de Óleo de Cróton .....	24
3.6. Avaliação da Atividade Enzimática da Mieloperoxidase (MPO) .....	24
3.7. Avaliação da Atividade Enzimática da n-acetil-β-D glucosaminidase (NAG) .....	25

3.8. Análise Histológica .....	26
3.9. Análise Imunohistoquímica .....	26
3.10. Análise Estatística .....	27
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
4.1. Efeito do EE e do TTHL no edema de orelha induzido por TPA .....	29
4.2. Avaliação curso temporal do efeito do EE sobre o edema de orelha induzido por TPA .....	35
4.3. Avaliação do efeito da interação do EE com a dexametasona .....	36
4.4. Efeito do Extrato Etanólico das Flores de <i>C. leprosum</i> (EE) no edema de orelha induzido por AA .....	38
4.5. Efeito do Extrato Etanólico das Flores de <i>C. leprosum</i> (EE) no edema de orelha induzido por Fenol .....	38
4.6. Efeito do Extrato Etanólico das Flores de <i>C. leprosum</i> (EE) no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de Óleo de Cróton .....	39
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>66</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>68</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	<i>Combretum leprosum</i> (Mofumbo) .....	<b>14</b>
<b>FIGURA 2</b>	Estrutura molecular do triterpeno TTHL .....	<b>15</b>
<b>FIGURA 3</b>	Efeito do EE no edema de orelha e na atividade da enzima MPO induzidos por TPA .....	<b>30</b>
<b>FIGURA 4</b>	Efeito do TTHL no edema de orelha e na atividade da enzima MPO induzidos por TPA .....	<b>31</b>
<b>FIGURA 5</b>	Efeito do EE sobre a atividade da enzima MPO <i>in vitro</i> .....	<b>32</b>
<b>FIGURA 6</b>	Análise histológica do efeito do EE e do TTHL sobre o edema e influxo celular no edema de orelha induzido por TPA .....	<b>33</b>
<b>FIGURA 7</b>	Efeito do EE e do TTHL sobre a migração leucocitária induzida pela aplicação de TPA .....	<b>34</b>
<b>FIGURA 8</b>	Efeito do EE por via oral no edema de orelha induzido pela aplicação de TPA .....	<b>35</b>
<b>FIGURA 9</b>	Avaliação curso temporal do efeito antiedematogênico tópico do EE .....	<b>36</b>
<b>FIGURA 10</b>	Efeito da interação entre EE e dexametasona por via tópica no edema de orelha induzido por TPA .....	<b>37</b>
<b>FIGURA 11</b>	Efeito do EE administrado por via tópica no edema de orelha induzido pela aplicação de AA .....	<b>38</b>
<b>FIGURA 12</b>	Efeito do EE administrado por via tópica no edema de orelha induzido pela aplicação de fenol .....	<b>39</b>
<b>FIGURA 13</b>	Efeito do EE no edema induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton .....	<b>40</b>
<b>FIGURA 14</b>	Análise histológica do efeito do EE sobre o edema, influxo celular e hiperproliferação epidérmica no edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton.....	<b>41</b>
<b>FIGURA 15</b>	Efeito do EE sobre a hiperproliferação epidérmica no edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton .....	<b>42</b>
<b>FIGURA 16</b>	Efeito do EE na atividade da enzima MPO induzido pela	

	aplicação múltipla de óleo de cróton.....	<b>43</b>
<b>FIGURA 17</b>	Efeito do EE na atividade da enzima NAG induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton .....	<b>43</b>
<b>FIGURA 18</b>	Efeito do EE sobre a migração leucocitária induzida pela aplicação múltipla de óleo de cróton .....	<b>44</b>
<b>FIGURA 19</b>	Efeito do EE sobre a atividade da enzima NAG <i>in vitro</i> .....	<b>45</b>
<b>FIGURA 20</b>	Análise imunohistoquímica do efeito do EE sobre a expressão de PCNA em células epidérmicas induzida pela aplicação múltipla de óleo de cróton .....	<b>46</b>
<b>FIGURA 21</b>	Efeito do EE sobre a hiperproliferação epidermal induzida pela aplicação múltipla de óleo de cróton .....	<b>47</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA - Ácido Araquidônico  
AINE - Antiinflamatório não Esteroidal  
AP-1 - Proteína Ativadora-1  
cAMP – 3', 5' - Adenosina Monofosfato Cíclico  
BSA - Albumina Bovina Fração V segundo Cohn  
CEEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal  
CNIP/APNE – Centro Nordeste de Informações sobre Plantas/Associação Plantas do Nordeste  
COX - Cicloxigenase  
DAB - Diamino-benzidina  
Dexa - Dexametasona  
DI<sub>50</sub> – Dose do EE ou TTHL que reduziram a resposta em 50%  
EE - Extrato Etanólico das flores de *Combretum leprosum*  
EPM - Erro Padrão da Média  
ERK – Quinase Reguladora de Sinal Extracelular  
HE - Hematoxilina-eosina  
HTAB - Hexadeciltrimetilamônio  
IFN- $\gamma$  - Interferon  $\gamma$   
IgE – Imunoglobulina E  
IgG – Imunoglobulina G  
IKK - Complexo I $\kappa$ B Quinase  
IL - Interleucina  
I<sub>max</sub> – Inibição Máxima  
KGF - Fator de Crescimento de Queratinócitos  
LOX - Lipoxigenase  
LT - Leucotrieno  
LTB<sub>4</sub> - Leucotrieno B<sub>4</sub>  
LX - Lipoxinas  
MAPK - Proteína Quinase Ativada por Mitógeno  
mDO – mili-Densidade Óptica  
MPO - Mieloperoxidase  
NAG - n-acetil- $\beta$ -D glucosaminidase

NF- $\kappa$ B - Fator de Transcrição Nuclear – Kappa B  
OC - Óleo de Cróton  
OMS - Organização Mundial da Saúde  
PBS – Tampão Fostato de Sódio  
PCNA - Antígeno Nuclear de Proliferação Celular  
PG - Prostaglandina  
PGE<sub>2</sub> - Prostaglandina E<sub>2</sub>  
PKC - Proteína Quinase C  
PLA2 - Fosfolipase A2  
PMN – Polimorfonucleares  
ROS - Espécies Reativas do Oxigênio  
TGF - Fator de Crescimento Transformante  
TMB - Tetrametilbenzidina  
TNF - Fator de Necrose Tumoral  
TPA - 12-O-tetradecanoilforbol acetato  
TTHL - 3 $\beta$ ,6 $\beta$ ,16 $\beta$ -trihidroxilup-20(29)-eno

## **INTRODUÇÃO**

---



# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1. Pele e Processo Inflamatório**

A pele é o maior órgão do corpo humano e é responsável por quatro funções principais: a homeostasia endógena, quando, por exemplo, regula a temperatura corporal, o metabolismo, ao produzir algumas vitaminas importantes como a vitamina B, a sensação do tato, e ainda pela proteção contra ameaças externas e perda de água. Por estar em contato direto com o meio ambiente, a principal função da pele é proteger o organismo de possíveis agressões formando, portanto uma barreira entre os órgãos internos e o meio externo. A pele é ainda o componente periférico do sistema imune, sendo capaz de iniciar uma resposta imune primária frente a um patógeno. É na verdade um órgão complexo que envolve diversos tipos celulares e estruturas, estando esses divididos em três camadas principais: epiderme, derme e hipoderme que é a camada de tecido adiposo (DEBENEDICTIS et al., 2001; MAKRANTONAKI e ZOUBOULIS, 2007; SPELLBERG, 2000).

A epiderme é a camada mais externa e, portanto, é a responsável pela proteção contra traumas mecânicos, por impedir a perda de água e a entrada de patógenos provenientes do meio ambiente como bactérias e toxinas (MAKRANTONAKI e ZOUBOULIS, 2007; DENNING, 2004). Nessa região da pele os queratinócitos são as principais células encontradas, as quais formam um epitélio estratificado pavimentoso constituído de cinco camadas: camada basal, camada espinhosa, camada granulosa, camada lúcida e camada córnea. Essas células surgem na camada basal através de mitoses constantes e posteriormente migram através das sucessivas camadas enquanto vão se diferenciando. Ao se aproximarem da superfície, ou seja, na camada córnea, os queratinócitos já apresentam a morfologia totalmente alterada, já não possuem mais núcleo e assim morrem e descamam. Essa migração e diferenciação que ocorrem constantemente na epiderme a tornam uma estrutura bastante dinâmica (GNIADECKI, 1998; GARTNER e HIATT, 1999). Assim, é de grande importância a regulação do processo de proliferação dos queratinócitos, pois possíveis distúrbios no crescimento dessas células podem ser responsáveis pela patogênese de diversas doenças de pele, como por

exemplo, psoríase, lesões crônicas e câncer de pele. Nos queratinócitos os responsáveis por esse controle são principalmente quinases dependentes de ciclinas, as quais orientam a transição entre as fases G1 e S do ciclo celular dessas células (GNIADCKI, 1998).

Na epiderme ainda são encontrados os melanócitos que são as células responsáveis pela produção de pigmentos, e as células de Langerhans que são células apresentadoras de antígenos (DENNING, 2004). Próximo a essas células encontram-se também alguns linfócitos T, que são geralmente células de memória (SPELLBERG, 2000).

Como a epiderme não possui vasos sanguíneos, esta se encontra intimamente apoiada à derme através de uma lâmina basal sendo, portanto a derme responsável pelo suporte sanguíneo da epiderme. A derme tem então como funções prover o suporte de nutrientes para a epiderme e realizar a termorregulação, além disso, as células dessa camada têm papel fundamental em processos inflamatórios e cicatriciais (MAKRANTONAKI e ZOUBOULIS, 2007). Essa região da pele é por sua vez dividida em duas camadas. A primeira é a camada papilar que é mais superficial e frouxa, pois suas fibras de colágeno e fibras elásticas são pouco organizadas e finas. Já a camada reticular é mais profunda e mais densa apresentando fibras elásticas espessas firmemente entrelaçadas com fibras de colágeno grossas e bem organizadas (SORRELL e CAPLAN, 2004; GARTNER e HIATT, 1999).

As principais e mais abundantes células da derme são os fibroblastos, os quais são os responsáveis por sintetizar colágeno, elastina, glicosaminoglicanas, proteoglicanas, fibronectina e outras proteínas da matriz extracelular, ou seja, as proteínas responsáveis pela estrutura, resistência e elasticidade da pele (MAKRANTONAKI e ZOUBOULIS, 2007; GARTNER e HIATT, 1999). É também a abundante matriz extracelular presente na derme a responsável por tornar essa região o ambiente ideal para o tráfego e permanência de células como leucócitos. Assim, entre os componentes celulares residentes na derme encontram-se linfócitos que em sua maioria são células T de memória, macrófagos que representam a maior parte dos leucócitos presentes em uma derme saudável, e também são encontrados mastócitos. Todas essas células atuam como sentinelas, capazes de se ativar frente ao primeiro estímulo nocivo e assim produzir sinais que permitam o

recrutamento de outras células inflamatórias como os neutrófilos (SPELLBERG, 2000).

Uma pele saudável é capaz de se renovar normalmente como todos os outros órgãos do organismo, e ainda tem uma grande capacidade de auto-regeneração quando sofre lesões. Como a manutenção de sua integridade é indispensável para o desempenho de suas funções em condições ótimas, ela própria possui um mecanismo que em condições normais e através da renovação constante de células das camadas mais profundas, assegura a manutenção de sua estrutura normal (ROCHE, 2005). O sistema imune de uma pele normal age constantemente de maneira a protegê-la de infecções e de possíveis descontroles nos processos fisiológicos normais, além de, remover células danificadas e fazer a prevenção de reações auto-imunes (BENNETT et al., 2008). Para tanto, as células teciduais residentes são especializadas em produzir substâncias que irão desencadear uma resposta inflamatória, caso seja necessário, no intuito de restabelecer a fisiologia normal da pele (DEBENEDICTIS et al., 2001).

Após uma lesão tecidual é iniciada uma cascata de eventos que irão mediar a reparação tecidual e o reestabelecimento da função protetora da pele. A resposta inflamatória é um processo no qual o corpo utiliza o sistema imune para agir contra possíveis patógenos e pode ser definida como uma seqüência de eventos que ocorrem em resposta a um estímulo nocivo, um trauma ou infecção. Esses eventos são dirigidos pela interação entre células e mediadores inflamatórios (CALIXTO et al., 2004; FREINKEL e WOODLEY, 2001).

Entretanto, essa resposta é muito mais complexa e sofisticada do que se imaginou a princípio e é caracterizada pela ativação coordenada de várias vias de sinalização que regulam a expressão tanto de mediadores pró quanto antiinflamatórios, ambos apresentando importantes funções na mediação desse processo (LAWRENCE e GILROY, 2007). A mobilização dessas vias gera fenômenos que refletem no surgimento dos sinais cardinais da inflamação, que são dor, eritema, aumento da temperatura local e edema, como uma resposta aguda ao processo inflamatório estabelecido (SMITH et al., 1998).

A geração de uma resposta rápida requer a ação de células que atuam como sentinelas no tecido, geralmente esses tipos celulares são macrófagos residentes e mastócitos teciduais, que desempenham essa função de sinalizadores primários. Ao sofrerem ativação e degranulação, essas células conseqüentemente liberam uma gama de mediadores inflamatórios incluindo, citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos assim como aminas vasoativas. Ao exercerem suas funções esses mediadores irão promover a atração e ativação de células inflamatórias e também a formação de edema. Entre as substâncias liberadas estão histamina, eicosanóides e triptases que são os principais responsáveis pela geração da resposta vasomotora local (NATHAN, 2002; LAWRENCE e GILROY, 2007).

Num primeiro momento observa-se uma vasoconstrição reflexa que persiste apenas por alguns minutos quando então dá lugar a vasodilatação que vai por sua vez gerar o eritema e o calor característicos da inflamação. Essa transição de vasoconstrição para vasodilatação é mediada por diversos fatores entre os quais produtos endoteliais e fatores derivados de mastócitos como leucotrienos (LT), prostaglandinas (PG) e também histamina. Além do eritema e calor, a vasodilatação proporciona ainda a formação de edema que é causado pela passagem do fluido vascular para o interstício devido ao aumento da permeabilidade vascular. A principal função da mudança da permeabilidade celular é facilitar a disponibilidade de células e mediadores inflamatórios para os locais de lesão (ALLER et al., 2006).

A inflamação aguda é caracterizada pelo recrutamento de diversos componentes do sangue que deixam o espaço intravascular de forma a ocupar o interstício onde vão desempenhar suas principais funções nas sucessivas fases da resposta inflamatória. Assim cabe ao endotélio vascular mediar, de forma bidirecional, a interação entre o fluxo sanguíneo e o interstício que é o local onde ocorre o processo inflamatório propriamente dito. Classicamente, essa interação é definida pela passagem inicial de granulócitos polimorfonucleares (PMN) atraídos por mediadores inflamatórios liberados no local da lesão (ALLER et al., 2006; LAWRENCE e GILROY, 2007).

Após o estabelecimento desses eventos iniciais, os tecidos são então invadidos por células inflamatórias as quais estabelecem um dinâmico *crosstalk* entre si e com as células residentes. Primeiramente mediadores derivados de

macrófagos como, fator de necrose tumoral (TNF) e quimiocinas, irão atrair mais neutrófilos para o local, assim como ativá-los. Esses mediadores, especialmente TNF- $\alpha$  e Interleucina (IL)-1 $\beta$  combinam-se ainda com outros como, prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) derivada de mastócitos e defensinas derivadas dos neutrófilos para recrutar linfócitos enquanto que os leucotrienos atraem células dendríticas apresentadoras de antígeno. Os linfócitos por sua vez irão promover a ativação de macrófagos, levando-os a secretar proteases, eicosanóides, citocinas e espécies reativas de oxigênio, os quais irão ativar outras células formando assim um ciclo de recrutamento e ativação celular (NATHAN, 2002). As cininas também são importantes mediadores os quais promovem a liberação de citocinas como interleucina (IL)-1 e TNF, e a geração de mediadores como PG e LT, auxiliando no início e na manutenção da reação inflamatória (COUTANT e RYDER, 1996; CALIXTO et al., 2000; BHOOLA et al., 1992).

As citocinas representam uma classe de mediadores de extrema importância para o processo inflamatório, pois formam um grupo de substâncias multifuncionais envolvidas em diversas etapas da inflamação, podendo influenciar a resposta inflamatória de forma a favorecer ou inibir o processo. Geralmente as citocinas pro-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  e IL-18, estão envolvidas no início e amplificação da resposta, enquanto que as anti-inflamatórias como IL-10 e fator de crescimento transformante (TGF)  $\beta$ , modulam esses eventos de forma negativa, no intuito de controlar o estabelecimento do processo. As citocinas são produzidas pelas células residentes e também pelas inflamatórias infiltradas como mastócitos, macrófagos e neutrófilos, e uma vez liberadas essas substâncias poderão agir de maneira local, interagindo com as células presentes no foco inflamatório ou de maneira sistêmica ao influenciar células da corrente sanguínea ou de outros tecidos. Um grupo peculiar de citocinas é responsável por atrair e ativar leucócitos e por serem substâncias quimioatratoras recebem o nome de quimiocinas, e entre as de maior importância estão IL-8 e RANTES (LAWRENCE e GILROY, 2007; CALIXTO et al., 2004).

As citocinas, por meio de receptores próprios, promovem a ativação de fatores de transcrição como fator de transcrição nuclear – Kappa B (NF-kB) e proteína ativadora-1 (AP-1) e também de proteínas quinases como proteínas

quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e proteína quinase C (PKC) que por sua vez vão regular a expressão de muitos genes alvo indispensáveis para a manutenção do processo inflamatório. A ativação de MAPK leva a direta ou indireta fosforilação de diversos fatores de transcrição, como AP-1, que vão se ligar a promotores de genes pró-inflamatórios. O complexo I $\kappa$ B quinase (IKK) por sua vez, quando ativado, torna-se responsável pela fosforilação da subunidade I $\kappa$ B o que leva a ativação do NF- $\kappa$ B, que é um regulador central das respostas inflamatória e imune (LAWRENCE e GILROY, 2007; CALIXTO et al., 2004).

A inflamação é parte de um processo fisiológico de reparação. Entretanto, quando o processo não é bem controlado a resposta pode se espalhar, perdendo sua função reparadora e podendo causar algum dano. Curiosamente, são os mesmos elementos celulares e moleculares que modulam essas duas características funcionalmente distintas, a função reparadora e também a causadora de danos (ALLER et al., 2006).

Para que a função homeostática do sistema imune cutâneo funcione de maneira apropriada, os diversos sinais pró-inflamatórios que podem ser gerados pelas células dessa região, devem ser contrabalanceados por mecanismos capazes de promover a resolução de um processo inflamatório cutâneo. Possíveis falhas nesses mecanismos podem predispor ao desenvolvimento de processos inflamatórios crônicos na pele (WILLIAMS e KUPPER, 1996; BUCKLE e HEDGECOCK, 2007).

Os receptores e as vias de sinalização que iniciam e promovem a resposta inflamatória são bem caracterizados, entretanto pouco se sabe a respeito de como essa resposta aguda é reparada de forma a impedir que evolua para uma inflamação crônica. Para uma resolução bem sucedida é de fundamental importância a neutralização e remoção dos agentes que causaram o processo inflamatório, e uma falha nessa etapa inicial com certeza pode levar a cronificação (LAWRENCE e GILROY, 2007; WILLOUGHBY et al., 2000).

Um evento que reflete a transição do processo inflamatório para o de resolução é a substituição de PMN ou eosinófilos por monócitos e macrófagos fagocíticos. A citocina IL-6 parece ser o principal determinante dessa troca de PMN por monócitos, além dos eicosanóides que também parecem auxiliar nessa transição. As lipoxinas (LX), que são produtos do metabolismo do ácido

araquidônico (AA), inibem a quimiotaxia de PMN, assim como sua adesão e transmigração. Assim, parece que quando o processo inflamatório precisa ser reparado, IL-6 e LX, são os primeiros mediadores a agir (WILLOUGHBY et al., 2000; LAWRENCE e GILROY, 2007).

As vias de remoção dos leucócitos inflamatórios incluem a recirculação sistêmica e morte local seguida de fagocitose por macrófagos provenientes do influxo de monócitos. Após a fagocitose, os macrófagos podem deixar o local inflamado através da circulação linfática ou podem ainda sofrer apoptose no próprio local (WILLOUGHBY et al., 2000; LAWRENCE e GILROY, 2007). A apoptose de células inflamatórias é um processo fisiológico que ocorre para a remoção de células sem que haja a liberação de agentes tóxicos. As células apoptóticas expressam em sua superfície moléculas específicas que permitem o seu reconhecimento por fagócitos. O reconhecimento dessas células por macrófagos pode causar a liberação de sinalizadores antiinflamatórios como IL-10 e TGF $\beta$ . Portanto, a apoptose e fagocitose são cruciais no processo de reparação, sendo que falhas nesses mecanismos podem levar a cronicidade (WILLOUGHBY et al., 2000; LAWRENCE e GILROY, 2007).

Quando os processos de fagocitose, recirculação e apoptose ocorrem de maneira correta e coordenada, a inflamação se resolve e a reparação tecidual é alcançada com sucesso. Entretanto, é necessária a perfeita interação entre a ação dos mediadores pró e antiinflamatórios, caso contrário, podem surgir doenças inflamatórias e na pele este processo não é diferente (Pietrovski et al., 2008).

As doenças de pele podem ser desencadeadas tanto por estímulos endógenos como mutações gênicas, quanto por estímulos exógenos como a exposição a agentes irritantes. São diversos os tipos de doenças cutâneas as quais são geralmente marcadas por características como interrupção da barreira e conseqüente perda da função de proteção, inflamação, sensibilização e alterações no padrão de proliferação e diferenciação de queratinócitos (PROKSCH et al., 2008).

Uma das doenças de pele de maior incidência é a psoríase a qual promove um alto impacto na qualidade de vida do paciente por afetar não somente a pele, mas também gerar situações de embaraço, medo, depressão, problemas de auto-estima e com a imagem corporal. E todos esses

sentimentos afetam diretamente diversos aspectos da vida do paciente como o relacionamento pessoal, prática de esportes, sexualidade, cuidados pessoais e atividades no trabalho e na escola (VAN DE KERKHOF et al., 2008; SEELIGER et al., 2003).

A psoríase é uma doença de pele crônica que afeta aproximadamente 2% da população. Essa doença normalmente se manifesta através de placas avermelhadas e descamativas com as bordas bem delimitadas que aparecem principalmente nos cotovelos, joelhos, couro cabeludo e região lombar. A forma mais comum de psoríase é a psoríase *vulgaris* a qual pode se manifestar de forma moderada a severa variando de acordo com a área da superfície corporal envolvida e também com o impacto na qualidade de vida do paciente. Aproximadamente 20% dos pacientes com psoríase desenvolvem artrite psoriática que é uma manifestação extracutânea da doença bastante debilitante (SCHÖN & BOEHNCKE, 2005).

A maior parte das doenças inflamatórias cutâneas ainda não possui sua etiologia e fisiopatologia bem definidos, como é o caso da psoríase. Essa falta de informação prejudica principalmente o tratamento dessas doenças. Atualmente os tratamentos terapêuticos disponíveis não são totalmente eficazes, sendo que aqueles que promovem melhoras no quadro do paciente promovem também uma gama de efeitos indesejáveis. Assim, a busca por novas estratégias que se mostrem seguras e eficazes em prevenir a formação de edema, o extravasamento plasmático e o recrutamento de mediadores inflamatórios é um caminho promissor para se encontrar terapias adequadas no combate de reações inflamatórias excessivas (SEELIGER et al., 2003; MAN et al., 2008). Uma alternativa interessante nessa busca por novas terapias seria a utilização de plantas medicinais.

## **1.2. Uso de Plantas Medicinais**

A relação entre homens e plantas parece existir desde a existência do ser humano sendo que os primeiros documentos que mostram essa relação datam da era Paleolítica. O uso de produtos naturais, principalmente aqueles derivados de plantas, é uma forma tradicional de promover alívio de doenças, utilizada a mais de cinco milênios em diversas civilizações. Já há muitos



séculos as plantas passaram a ser buscadas pelo homem como principais fontes de drogas, para estabelecer a cura ou o alívio de doenças (SAKLANI e KUTTY, 2008; CALIXTO, 2005; YESILADA, 2005).

No tratamento de problemas na pele e desordens dermatológicas, o emprego de plantas não tem sido diferente, já que indícios indicam que as plantas são utilizadas desde a antiguidade para tratar especialmente feridas, cortes e queimaduras. Historicamente, acredita-se que Alexandre, o Grande, durante suas batalhas teria parado em uma ilha chamada Socotra, a qual possuía grandes quantidades de plantas do gênero *Aloe* e estas teriam sido utilizadas para o tratamento das feridas provenientes dos combates (KUMAR, 2007).

As plantas foram por muito tempo, e continuam sendo até os dias atuais, a base de muitos sistemas medicinais tradicionais no mundo todo, como homeopatia, fitoterapia e outros sistemas de medicina alternativa. Além disso, as plantas medicinais são uma das melhores e mais efetivas fontes de compostos candidatos a novas classes de medicamentos, já que representam fontes riquíssimas de diversidade natural ao considerarmos a amplitude dos compostos que sintetizam, muitos dos quais têm se mostrado útil na terapêutica para tratar uma variedade de doenças e males humanos. O conhecimento medicinal tradicional, junto a técnicas modernas têm acelerado o processo de descoberta de drogas derivadas de plantas. (ITOKAWA et al., 2008; SAKLANI e KUTTY, 2008; KOLEWE, 2008) Aproximadamente 25% de todas as drogas modernas disponíveis são derivadas direta ou indiretamente de plantas. Entre esses exemplos estão a morfina e o salicilato que permitiram o desenvolvimento das maiores classes de drogas analgésicas, os opióides e os antiinflamatórios não esteroidais (AINE) (CALIXTO, 2005). Entretanto, acredita-se que apenas 10 a 15% da diversidade vegetal disponível tem sido explorada quanto a seu potencial farmacológico. Mesmo com sofisticados métodos de análises disponíveis, ainda existem lacunas consideráveis no conhecimento de princípios ativos de muitas plantas medicinais (PHILLIPSON, 2007; SAKLANI e KUTTY, 2008).

Práticas médicas tradicionais conservadas durante anos pelas civilizações servem como uma base efetiva na descoberta e desenvolvimento de novas drogas terapêuticas modernas, esse tipo de base maximiza a probabilidade de

se obter uma droga de sucesso (GOLENIOWSKI et al., 2006; STEPP, 2004). O isolamento e utilização de substâncias derivadas de plantas como fármacos foram precedidos por séculos de uso etnobotânico. Para muitas dessas plantas utilizadas na medicina popular, já é possível comprovar o que a medicina tradicional reportou durante milênios. Além disso, hoje novas moléculas biologicamente ativas, derivadas de vegetais, têm sido descobertas, como foi o caso da quinina, glicosídeos digitálicos e reserpina. A cada dia torna-se mais comum componentes que emergiram de extratos etnobotânicos como importantes ferramentas farmacológicas para a elucidação de mecanismos de doenças e como peças centrais no incentivo do desenvolvimento da indústria farmacêutica moderna (RISHTON, 2008; LENTINI, 2000).

Além das informações etnobotânicas, outro grande incentivo a pesquisa com plantas é o fato de que, apesar do grande número de compostos industriais utilizados na clínica, a fitoterapia tradicional é ainda utilizada principalmente em muitas áreas rurais de países em desenvolvimento aonde os tratamentos vão sendo passados de geração a geração. A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem chamado a atenção quanto a importância desse tipo de medicina tradicional já que aproximadamente 65-80% da população mundial vive em condições de pobreza e não têm acesso a medicina moderna, dependendo somente de praticantes da medicina tradicional e do uso de plantas medicinais como atenção primária a saúde (GOLENIOWSKI et al., 2006; PHILLIPSON, 2007). Atualmente, até mesmo em países desenvolvidos, as pessoas estão preferindo terapias alternativas às modernas, obviamente na busca da diminuição dos efeitos colaterais (KUMAR, 2007).

Entretanto, mesmo com a evidente utilização na clínica, poucas plantas têm sido estudadas cientificamente para a confirmação de sua qualidade, segurança e eficácia. Sendo que ao contrário dos milhões de dólares e vários anos de pesquisa necessários para desenvolver uma nova droga por síntese, os fitoterápicos exigem menores esforços e parecem ser perfeitamente viáveis em países subdesenvolvidos (CALIXTO, 2005). Somente de 1 a 3% das plantas citadas na farmacopéia ocidental são designadas para o uso tópico e menos de um terço das plantas medicinais é utilizado no tratamento de distúrbios cutâneos e feridas. Entretanto, ainda é necessário saber mais a respeito de lesões de pele crônicas e sua patogênese, uma vez que, a não

cicatrização e o desconhecimento da patogênese tem intensificado o uso de plantas medicinais como agente cicatrizantes (KUMAR, 2007).

Assim, cresce a cada dia a necessidade de estudar as propriedades curativas ocultas nas plantas. Estudos têm demonstrado que drogas derivadas de plantas e muitas preparações vegetais são capazes de alterar funções do sistema imune possuindo uma incrível gama de efeitos imunomodulatórios, e com a vantagem de não possuir efeitos imunossupressores, como ocorre com drogas utilizadas na clínica como os corticóides. Além disso, estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que plantas medicinais podem afetar a secreção de citocinas, liberação de histamina, proliferação de linfócitos e possuir atividade citotóxica (SAKLANI e KUTTY, 2008; PLAEGER, 2003). Pesquisas como essas, têm demonstrado que para muitas doenças complexas, produtos naturais representam uma fonte extremamente valiosa para a produção de novas entidades químicas, já que representam estruturas privilegiadas, selecionadas pelo mecanismo evolucionário através de um período de milhões de anos (CALIXTO, 2005).

### **1.3. *Combretum* – O Gênero**

A família Combretaceae consiste de 18 gêneros, dos quais o maior é o *Combretum* possuindo aproximadamente 370 espécies. Essas espécies são comumente utilizadas com propósitos medicinais estando amplamente distribuídas em diversas partes da África onde muitas vezes representam as espécies mais abundantes, podendo ser encontrados como árvores, arbustos ou trepadeiras. Em algumas regiões da África os principais usos dessas plantas são para o tratamento de doenças infecciosas como diarreia, gripe, sífilis e gonorréia, febre, dores musculares, hipertensão e edema, sendo que algumas espécies como *C. zeyheri* são utilizadas para tratar também tumores estomacais. Para tanto essas plantas são geralmente preparadas como decocções ou infusões a partir da planta seca ou, mais raramente, das folhas frescas. Essas espécies são ainda utilizadas no tratamento tópico de feridas e infecções na pele, em forma de pomadas adicionadas da matéria vegetal seca. Geralmente são utilizadas as folhas e raízes, sendo que os frutos são evitados

devido sua aparente toxicidade em humanos (FYHRQUIST, 2007; MACGAW et al., 2001).

Os estudos envolvendo espécies do gênero *Combretum* vêm crescendo e já proporcionaram o isolamento e identificação de diversos compostos com propriedades biológicas conhecidas, como taninos, flavonóides, saponinas, cumarinas, triterpenos, derivados do ácido elágico, glicosídeos antracênicos e derivados de fenantreno. Esses compostos são, provavelmente, os responsáveis pelas diversas propriedades biológicas comprovadas em pesquisas (FYHRQUIST, 2007).

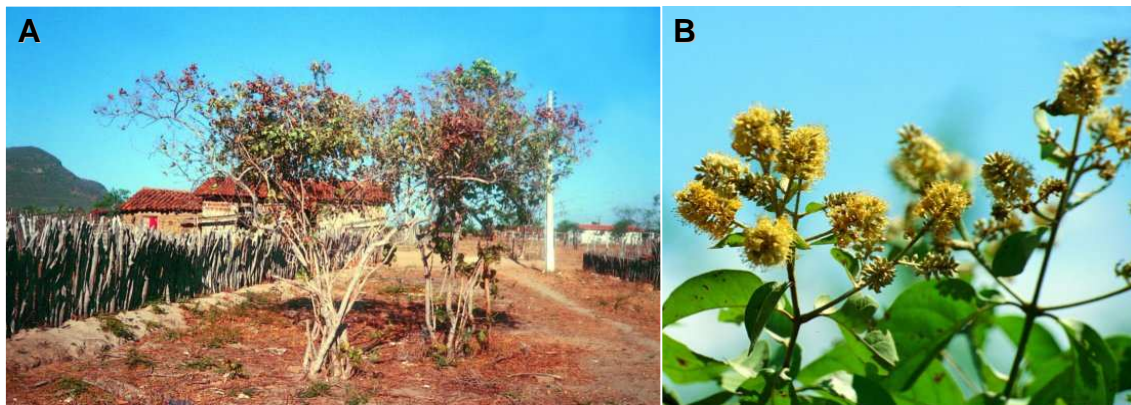
Recentes trabalhos envolvendo espécies do gênero *Combretum* têm evidenciado propriedades antimicrobianas, citotóxicas e anti-proliferativas referentes aos extratos e também aos compostos isolados. Angeh et al. (2007) demonstraram que triterpenos isolados do extrato das folhas de *Combretum imberbe* apresentaram forte atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*; atividade antiinflamatória ao inibirem de maneira bastante potente a enzima 3 $\alpha$ -hidroxisteróide desidrogenase e ainda, uma moderada atividade anti-proliferativa e citotóxica contra células das linhagens K-562, L-929 and HeLa.

Outros estudos foram conduzidos no intuito de verificar possíveis atividades biológicas do glicosídeo ácido móllico isolado de *Combretum molle*. Esses estudos demonstraram que esses compostos foram capazes de causar bradicardia, hipotensão e vasodilatação dependente do endotélio em ratos. Além disso, o composto também demonstrou ter atividade antiinflamatória e analgésica em modelos de edema de pata, contorções abdominais induzidas por ácido acético e no teste de placa quente (OJEWOLE, 2008a; OJEWOLE, 2008b).

#### **1.4. *Combretum leprosum***

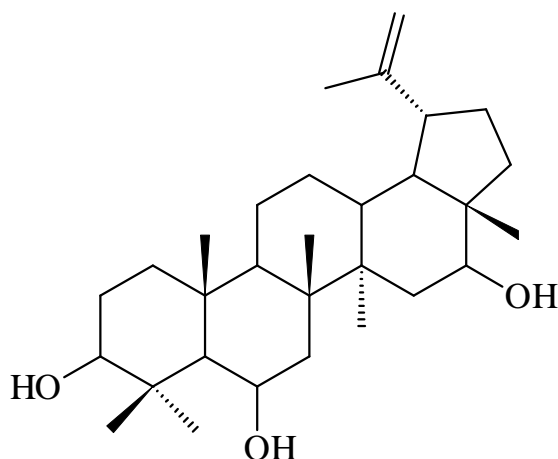
*Combretum leprosum* é uma espécie melífera encontrada nos estados do norte e nordeste brasileiros e também no Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (MARINHO et al., 2002; CHAVES et al., 2007). Conhecida popularmente pelos nomes de mofumbo, cipoaba e carne-de-vaca, a espécie é utilizada como planta medicinal com função cicatrizante, na prevenção de irritações cutâneas

e na limpeza de feridas, na contenção de hemorragias, como sedativo (PIETROVSKI et al., 2006), antitussígeno e expectorante (AGRA et al., 2007).



**Figura 1.** *Combretum leprosum* (Mofumbo). Planta inteira (A) e partes aéreas (B). Fonte: CNIP/APNE (2008).

Das folhas e raízes de *Combretum leprosum* foram isolados ácido arjunólico, ácido móllico, ácidos graxos, o triterpeno 3 $\beta$ ,6 $\beta$ ,16 $\beta$ -trihidroxilup-20(29)-eno (TTHL), flavonóides glicosilados 3-O-metilquercetina e quercetina. Análises do extrato etanólico das folhas demonstraram que os monossacarídeos são os principais componentes (80%), os triterpenos representam 10%, estando entre eles o ácido arjunólico e TTHL que são triterpenos pentacíclicos. O extrato ainda contém 5% de oligossacarídeos e 3% de ácidos graxos (FACUNDO et al., 2005; FACUNDO et al., 1993).



**Figura 2.** Estrutura molecular do triterpeno TTHL. Fonte: Pietrovski et al.(2006).

Embora não sejam muitos, os estudos envolvendo a investigação das atividades biológicas de *C. leprosum* apontam para ações semelhantes aquelas observadas em outras espécies do gênero. Facundo et al. (2005) demonstraram em seu estudo que tanto o extrato das raízes de *C. leprosum* como o composto isolado, ácido arjunólico, apresentaram atividade antiinflamatória ao reduzir o edema de pata induzido por carragenina, quando administrados por via oral. O ácido arjunólico, também administrado por via oral, foi ainda capaz de reduzir o edema de orelha induzido pela aplicação tópica de AA, entretanto não alterou o edema de orelha formado pela aplicação tópica do éster de forbol 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA), sugerindo que o composto estaria atuando ao influenciar a via de metabolismo do AA pela ação da enzima cicloxigenase (COX). Ainda nesse estudo, foi verificado que o extrato das raízes de *C. leprosum* foi capaz de inibir a atividade das enzimas butiril e acetilcolinesterase, sendo que foi comprovado ainda que o responsável por essa ação é o ácido arjunólico presente no extrato. Outro trabalho avaliou também a atividade do extrato etanólico das cascas da planta num modelo de úlcera induzida por indometacina, onde o extrato demonstrou possuir princípios ativos com atividade protetora da mucosa gástrica (MENESES et al., 2003).

Em seu trabalho Pietrovski et al. (2006) avaliaram a atividade antinociceptiva do extrato etanólico das flores de *C. leprosum* e também do composto isolado TTHL e observaram que o extrato foi capaz de inibir a nocicepção provocada em diferentes modelos como a hiperalgesia visceral

provocada por ácido acético, a hiperalgesia por calor na placa quente, e ainda, hiperalgesia neurogênica e inflamatória, nos modelos com formalina, capsaicina e glutamato. No modelo de nocicepção induzida por glutamato o efeito do extrato foi revertido pela administração de antagonistas de receptores opióides e por antagonistas de receptores de serotonina, sugerindo que o mecanismo esteja envolvendo os sistemas opióide e serotoninérgico. Entretanto, a antinocicepção não foi alterada frente à administração de L-arginina, que é o precursor do óxido nítrico. Ainda nesse modelo, o TTHL também foi capaz de reduzir a nocicepção causada pelo glutamato (PIETROVSKI et al., 2006).

O trabalho de Medeiros et al. (2003) verificou a ação analgésica do extrato etanólico das raízes de *C. leprosum*. Tanto o extrato quanto o ácido arjunólico foram capazes de reduzir contorções abdominais induzidas por ácido acético.

Corroborando com o uso popular, o extrato das frutas de *C. leprosum* demonstrou propriedades antiofídicas ao inibir a atividade proteolítica do veneno de *Bothrops jararacussu* e também a hemorragia causada pelo veneno de *B. jararaca*, o que demonstra a habilidade da espécie em inibir importantes atividades causadas pelo veneno de *Bothrops* (FERNANDES et al., 2007).

Estudos preliminares com o extrato hidroalcoólico das cascas da espécie demonstraram também atividade ansiolítica quando administrado por via oral, depressora central e relaxante muscular quando administrado por via intraperitoneal (ALMEIDA et al., 2003).

Assim, a *Combretum leprosum* é uma importante opção na medicina popular para o tratamento de problemas dermatológicos e lesões na pele, e apesar de existirem alguns trabalhos investigando suas atividades biológicas, ainda não existem dados científicos que comprovem sua eficácia antiinflamatória principalmente quando aplicada por via tópica. Sendo assim, torna-se interessante investigar a atividade antiinflamatório tópica do extrato assim como do composto TTHL, um triterpeno inédito isolado dessa espécie, o qual ainda possui poucos dados científicos acerca de sua atividade biológica.

## **OBJETIVOS**

---



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar a atividade antiinflamatória tópica do extrato bruto etanólico das flores de *Combretum leprosum*, assim como do composto isolado inédito TTHL, em modelos de inflamação cutânea em camundongos.

### **2.2. Objetivos específicos**

Verificar a ação antiinflamatória do extrato etanólico das flores de *C. leprosum* (EE) nos modelos de edema de orelha mediado por 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA), ácido araquidônico (AA) e fenol em camundongos;

Verificar a ação antiinflamatória do triterpeno isolado, TTHL, no modelo de edema de orelha mediado por TPA;

Verificar o efeito antiinflamatório do extrato etanólico das flores de *C. leprosum* em processos inflamatórios cutâneos crônicos, através do modelo de edema de orelha mediado pela aplicação múltipla do óleo de cróton em camundongos;

Verificar a ação do extrato de *C. leprosum* e do TTHL na migração celular nos modelos de edema de orelha induzido pelo TPA, AA e aplicação múltipla de óleo de cróton em camundongos, através de análises histológicas e da avaliação da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e n-acetil- $\beta$ -D glucosaminidase (NAG);

Verificar a ação do extrato de *C. leprosum* sobre a hiperproliferação celular no modelo de edema de orelha induzido por aplicação múltipla de óleo de cróton em camundongos, através de análise histológica e imunohistoquímica.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

---

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Material botânico**

As flores de *Combretum leprosum* foram coletadas em Cocalzinho-Viçosa, Estado do Ceará, Brasil em maio de 2007. A espécie foi identificada pelo Prof. Afrânio Fernandes (Universidade Federal do Ceará) em maio de 2001 e um exemplar encontra-se catalogado (n. 12446) no Herbário Prisco Bezerra no Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

#### **3.2. Obtenção do Extrato etanólico e isolamento, purificação e identificação química do composto**

A obtenção do extrato etanólico assim como o isolamento, a purificação e a identificação do composto isolado de *C. leprosum* foram realizados pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Valdir Alves Facundo do Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará. Primeiramente as flores foram secas e trituradas, e então submetidas à extração com etanol a temperatura ambiente. Foram realizadas três extrações sucessivas utilizando 5 litros de etanol em cada extração, e então o produto foi submetido a destilação do solvente sob pressão reduzida fornecendo 58,3 g de extrato.

Parte do extrato etanólico obtido nessa primeira etapa foi submetido a um fracionamento em coluna filtrante, utilizando como adsorvente sílica gel e tendo como fases solventes, hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, obtendo-se assim as respectivas frações. A fração clorofórmio foi então submetida a uma cromatografia em coluna de sílica gel tendo como fase fixa gel H (artigo 7761) da Merck e como fase móvel uma mistura de hexano e acetato de etila em polaridade crescente. Em quatro frações (27-30), extraídas com hexano:acetato de etila (3:7) foi observada a presença de um precipitado branco, através de recristalização com éter etílico foi feita a purificação da substância identificada por métodos químicos e espectroscópicos como sendo o triterpeno TTHL (FACUNDO et al., 1993).

### 3.3. Animais e Manutenção

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas (25-35 g) provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, CCB-UFPR. Os animais foram mantidos em condições de temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C), ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a água e ração comercial. Os animais foram mantidos na sala de experimento durante pelo menos uma hora antes da realização dos testes, para adaptação. Os experimentos foram realizados de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratórios (CEEAA, 2003) e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade Federal do Paraná sob o número 296.

### 3.4. Drogas e Reagentes

Para a realização dos experimentos foram utilizadas as seguintes drogas e reagentes: 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA), ácido araquidônico, óleo de cróton (OC), indometacina, Tetrametilbenzidina (TMB), p-nitrofenil-2-acetamida- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (Sigma Chemical Co, EUA), fenol (Merck Biosciences, Germany), dimetilformamida, acetona, formaldeído, ácido acético glacial, fosfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Merck Biosciences, Germany), albumina bovina fração V segundo Cohn (BSA) (Inlab, Brasil), peróxido de hidrogênio, álcool absoluto, eosina, hematoxilina, xilol, tween 80 (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), anticorpo primário anti-PCNA (sc-9857), anticorpo secundário Imunoglobulina G (IgG) conjugado a peroxidase (sc-2020) (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) e Kit revelador de cor DAB (diamino-benzidina) (BD Biosciences, CA, USA).

Para serem administrados por via tópica, o extrato etanólico das flores de *Combretum leprosum* (EE) e o composto isolado TTHL foram pré-solubilizados em 30% de etanol e então diluídos em 70% do volume final de acetona. Os agentes flogísticos (TPA, AA, fenol e óleo de cróton), assim como a dexametasona e a indometacina foram diretamente solubilizados em acetona

grau P.A. Já para a administração por via oral, tanto o EE quanto a dexametasona foram solubilizados em uma solução salina 0,9%.

### **3.5. Modelo de Edema de Orelha**

O modelo de edema de orelha é bastante útil na avaliação da atividade antiinflamatória tópica de compostos, uma vez que é uma metodologia bastante simples e que permite verificar a atividade de compostos no edema induzido por diferentes agentes irritantes, e ainda identificar compostos que tenham a capacidade de penetrar na pele (GARBOR, 2000).

#### **3.5.1. Avaliação do Edema**

O edema foi expresso como o aumento da espessura ( $\mu\text{m}$ ) da orelha dos camundongos. A espessura foi medida próxima à extremidade medial da orelha e a sua espessura foi registrada com o auxílio de um micrômetro digital (Great, MT-04513). O edema foi avaliado pela diferença entre a medida basal e a medida após determinado tempo da indução do processo inflamatório. Para minimizar variações referentes à técnica, os experimentos foram realizados sempre pelo mesmo experimentador. Os compostos, extratos e agentes flogísticos foram dissolvidos em um volume de 20  $\mu\text{L}$  de solvente e aplicados na orelha direita de cada camundongo.

#### **3.5.2. Avaliação do Edema Induzido pela Aplicação Tópica de TPA**

O TPA, um éster de forbol, é um dos constituintes ativos presentes no óleo de cróton capaz de induzir resposta inflamatória bastante intensa, provocando aumento da permeabilidade vascular, ativação da proteína quinase C, liberação dos metabólitos do ácido araquidônico, indução de enzimas, entre outros eventos. Assim, o edema foi induzido pela aplicação tópica do TPA (2,5  $\mu\text{g}$ /orelha) na orelha direita de camundongos. O extrato da planta (0,01 – 1 mg/orelha), o composto isolado (0,001 – 0,6 mg/orelha) assim como o controle positivo dexametasona (0,1 mg/orelha), foram aplicados logo após o TPA nos grupos experimentais. A espessura da orelha foi medida antes (basal) e 6

horas após a aplicação do TPA. Amostras dos tecidos das orelhas dos camundongos (círculos de 6 mm de tecido) foram coletadas 24 horas após a aplicação do TPA e submetidas a análise histológica e a avaliação da atividade da enzima MPO.

### **3.5.3. Avaliação do Edema de Orelha Induzido pela Aplicação Tópica de Ácido Araquidônico**

Ao ser metabolizado o ácido araquidônico dá origem a vários mediadores como prostaglandinas e leucotrienos, que promovem a formação do edema, (HUMES et al., 1986). Nesse modelo é possível identificar compostos que inibem esse metabolismo. O ácido araquidônico (2 mg/20 µL) foi administrado topicamente na orelha direita dos camundongos. Em seguida, o extrato (0,6 mg/orelha) e o controle positivo indometacina (2 mg/orelha) também foram aplicados topicamente. O edema foi avaliado 1 h após o desafio com o agente flogístico, conforme descrito no item 3.5.1. (YOUNG et al., 1984; CRUMMEY et al., 1987).

### **3.5.4. Avaliação do Edema de Orelha Induzido pela Aplicação Tópica de Fenol**

A dermatite induzida por fenol é um dos modelos animais de dermatite de contato utilizado para produzir irritação imediata. É um modelo de inflamação cutânea que mimetiza a dermatite de contato que ocorre em humanos (LIM et al., 2004). Para verificar a atividade do extrato nesse modelo o edema foi induzido pela aplicação tópica de fenol 10% em acetona (20 µL/orelha) na orelha direita de camundongos. O extrato (0,6 mg/orelha) assim como a dexametasona (0,1 mg/orelha), usada como controle positivo, foram aplicados imediatamente após o fenol nos grupos experimentais. A espessura da orelha foi medida antes (basal) e 2 h após a aplicação do agente flogístico, conforme descrito no item 3.5.1 (GÁBOR, 2000).

### **3.5.5. Edema de Orelha Induzido pela Aplicação Múltipla de Óleo de Cróton**

Esse é um modelo de inflamação crônica que permite avaliar a ação antiinflamatória do extrato frente a um processo inflamatório já estabelecido. O processo inflamatório crônico foi induzido pela aplicação do óleo de cróton (0,4 mg/orelha em 20 µL de acetona) em dias alternados durante 9 dias. O extrato (0,6 mg/orelha) e a dexametasona (0,1 mg/orelha, controle positivo), começaram a ser administrados a partir do quinto dia de experimento, sendo aplicados por via tópica durante 4 dias consecutivos (2 vezes ao dia) e o edema avaliado diariamente (STANLEY et al., 1991). No 9º dia do experimento os animais foram sacrificados e círculos de 6 mm de tecido das orelhas foram coletados, pesados e armazenados a – 70 °C para serem posteriormente submetidas a avaliação da atividade das enzimas MPO e NAG bem como a análise histológica e imunohistoquímica.

### **3.6. Avaliação da Atividade Enzimática da Mieloperoxidase (MPO)**

Para avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase foi utilizada a metodologia de Bradley et al. (1982) modificada por De Young et al. (1989). As amostras de tecido (círculos de 6 mm do tecido das orelhas de camundongos) foram adicionadas a 0,75 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM e pH 5,4 contendo 0,5% de HTAB e homogeneizado por cerca de 45 s a 0 °C. O homogenato foi decantado em microtubos e adicionado a 0,75 mL do tampão anteriormente descrito. A amostra (1,5 mL) foi colocada em microtubo e centrifugada a 11200 x g a 4 °C por 20 min. Triplicatas de 30 µL do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços, onde posteriormente foram adicionados 200 µL de uma mistura contendo 100 µL de tampão fosfato de sódio 80 mM pH 5.4, 85 µL de tampão fosfato de sódio (PBS) 0,22M pH 5.4 e 15 µL de peróxido de hidrogênio 0,017% em cada poço. A adição de 20 µL de TMB 18,4 mM dissolvida em uma solução aquosa de dimetilformamida a 8 %, promoveu o início da reação. A placa foi então incubada a 37 °C por 3 minutos, sendo a reação interrompida pela adição de 30 µL de acetato de sódio 1,46 M pH 3.0 em cada poço. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL 808) com comprimento de onda de 620 nm, sendo expressa em mDO/biópsia.

Para avaliar o efeito direto do extrato sobre a atividade da MPO o extrato foi incubado com a amostra do tecido previamente submetido a uma única aplicação de TPA. O homogenato da amostra tecidual foi adicionado à placa e posteriormente incubado com diferentes concentrações do EE (0,3 – 30  $\mu$ M/mL) durante 15 minutos. Em seguida, foi realizado o protocolo descrito anteriormente.

### **3.7. Avaliação da Atividade Enzimática da n-acetil- $\beta$ -D glucosaminidase (NAG)**

A avaliação da atividade dessa enzima é utilizada como indicativo da presença de leucócitos mononucleares os quais são de grande importância em processos inflamatórios crônicos. Portanto, esse ensaio foi realizado a partir de amostras de orelhas de camundongos submetidas à aplicação múltipla do óleo de cróton no modelo de inflamação crônica, seguindo a metodologia de Sanchez e Moreno (1999). As amostras (círculos de 6 mm de tecido da orelha dos camundongos) foram adicionadas a 0,75 mL de solução de fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4) contendo 0,5% de HTAB e homogeneizadas por cerca de 45 s a 0 °C. O homogenato foi decantado em microtubos e foram adicionados 0,75 mL do tampão anteriormente descrito. As amostras (1,5 mL) foram adicionadas em microtubos e centrifugadas a 11200 x g a 4 °C por 20 min. Triplicatas de 25  $\mu$ L do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços e posteriormente foi adicionado 100  $\mu$ L de tampão citrato 50 mM (pH 4,5). A reação foi iniciada pela adição de 25  $\mu$ L de p-nitrofenil-2-acetamida- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (2,24 mM) dissolvido água miliQ. A seguir a placa foi incubada a 37 °C por 1 h e a reação foi então interrompida pela adição de 30  $\mu$ L de tampão glicina 200 mM (pH 10,4) em cada poço. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente utilizando um leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL 808), cuja leitura foi realizada na absorbância de 405 nm e os resultados expressos como mDO/tecido.

A fim de avaliar o efeito do extrato diretamente sobre a atividade da NAG o extrato foi incubado com a amostra do tecido previamente submetido a uma única aplicação de TPA. O homogenato da amostra tecidual foi adicionado à placa e posteriormente incubado com diferentes concentrações do EE (0,3 – 30



$\mu\text{M/mL}$ ) durante 15 minutos. Em seguida, foi seguido o protocolo para verificação da atividade da enzima conforme descrito anteriormente.

### **3.8. Análise Histológica**

As amostras do tecido de orelhas coletadas dos camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido pelo TPA e pela aplicação múltipla de óleo de cróton foram fixadas em solução ALFAC (85 mL de álcool 80%, 10 mL de formol 40% e 5 mL de ácido acético glacial) num período de 16 horas, sendo em seguida conservadas em álcool 70% até início do processo de desidratação. As orelhas foram posteriormente desidratadas, emblocadas em parafina, seccionadas em cortes de 5  $\mu\text{m}$  em um micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina. A infiltração de leucócitos, edema e espessura da epiderme foram avaliadas em áreas representativas com aumento de 200x e/ou 400x. A quantificação dos leucócitos presentes na derme foi realizada através da contagem dessas células por campo com aumento de 400x, sendo analisados 5 campos de 3 cortes histológicos distintos.

### **3.9. Análise Imunohistoquímica**

Através da análise imunohistoquímica é possível verificar a expressão de marcadores celulares como marcadores de proliferação e diferenciação celular. Um desses marcadores é o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) que foi descrito como marcador da atividade proliferativa. Para verificar a expressão de PCNA, amostras de orelhas de animais submetidas à aplicação múltipla de óleo de cróton foram emblocadas em parafina (como descrito no item 3.5) e seccionadas em cortes de 5  $\mu\text{m}$  em um micrótomo. Estes cortes histológicos foram montados em lâminas contendo filme de silano 2%. As lâminas foram submetidas a banhos de xilol para desparafinização e em seguida foram hidratadas com banhos sucessivos em concentrações de álcool decrescentes. As lâminas foram então submetidas a um banho de glicina 0,1 M para o bloqueio dos radicais aldeídos, enquanto a peroxidase endógena e os sítios inespecíficos também foram bloqueados com banhos de  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% em metanol e PBS/BSA 1%, respectivamente. Os cortes foram então incubados

com o anticorpo anti-PCNA (1:50) durante duas horas a temperatura ambiente em câmara úmida. Após banho com PBS, as lâminas foram novamente incubadas, desta vez com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:50) durante uma hora a temperatura ambiente e em câmara úmida. As lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com kit contendo o cromógeno DAB durante 15 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas, contracoradas com hematoxilina e os cortes foram desidratados com banhos sucessivos de álcool em concentrações crescentes. A presença de células positivas para o marcador PCNA foi quantificada em áreas representativas com aumento de 400x em microscópio óptico. A quantificação foi realizada através da contagem do número de células positivas por campo, sendo analisados 5 campos de 3 cortes histológicos distintos.

### **3.10. Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), exceto para os valores das  $DI_{50}$  (dose necessária para reduzir em 50% as respostas dos grupos tratados em relação ao grupo controle), que foram representados como a média geométrica acompanhada de seus respectivos intervalos de confiança de 95%. Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de múltipla comparação de Newman-Keuls. Valores de P menores do que 0,05 ( $P < 0,05$ ) foram considerados como indicativos de significância. Os cálculos foram realizados utilizando o Software estatístico GraphPad Prism version 3.00, San Diego Califórnia, EUA.

## **RESULTADOS**

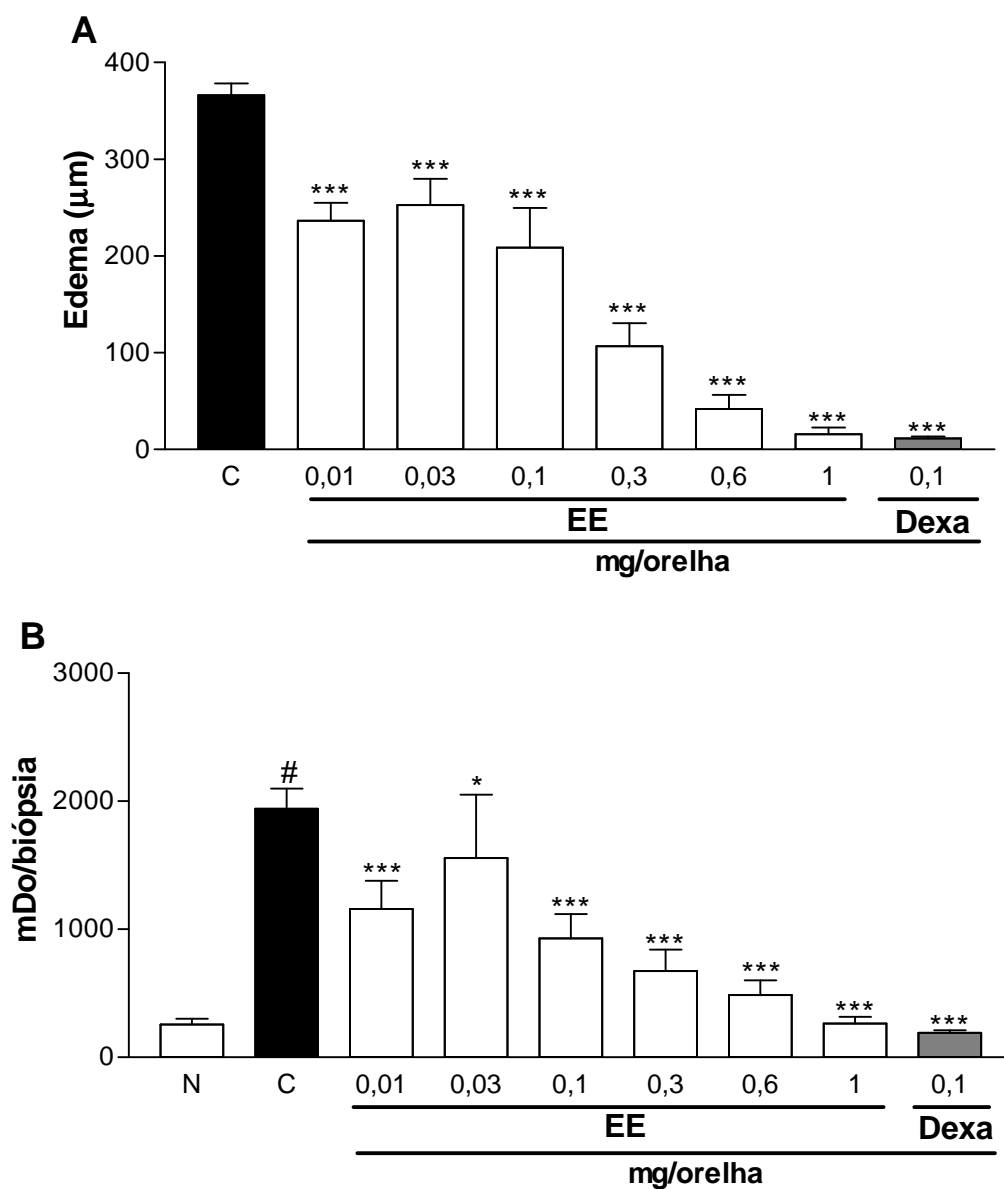
---

## 4. RESULTADOS

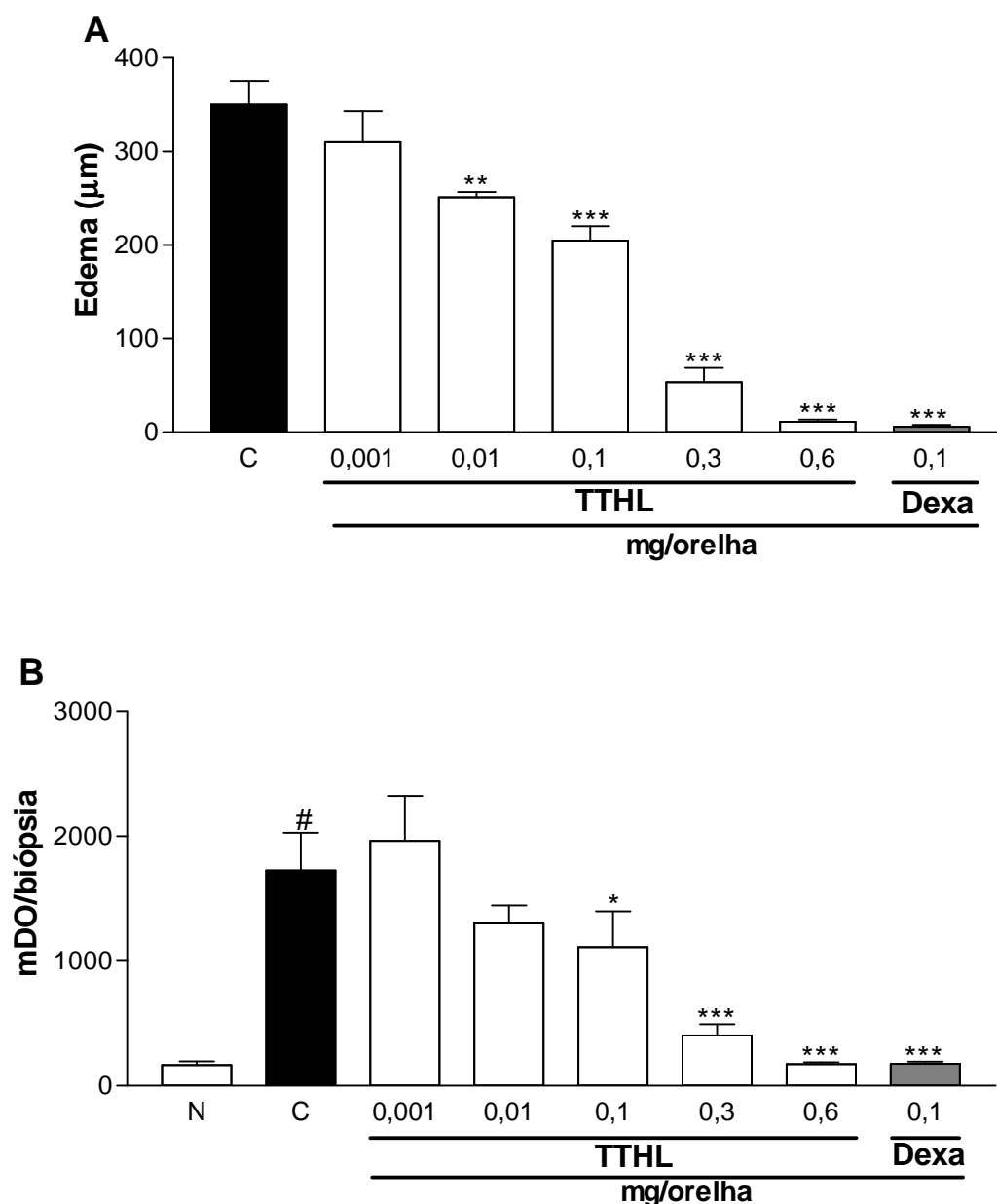
### 4.1. Efeito do EE e do TTHL no edema de orelha induzido por TPA

Observa-se na figura 3A que após seis horas da aplicação de TPA ocorre a formação significativa de edema, demonstrado pelo aumento na espessura da orelha. A aplicação do EE (0,01–1 mg/orelha) foi capaz de reverter a formação do edema de maneira dependente da dose, apresentando inibição máxima ( $I_{\max}$ ) de  $96 \pm 2\%$  na dose de 1 mg/orelha, e  $DI_{50}$  de 0,11 (0,10-0,13) mg/orelha. O controle positivo dexametasona também inibiu a formação do edema ( $97 \pm 1\%$ ). Ainda nesse modelo, foi avaliada a ação do extrato sobre a atividade da enzima mieloperoxidase. A aplicação tópica de TPA promoveu o aumento da atividade da enzima MPO em 24 horas. Esse aumento foi revertido pela aplicação tópica do EE de maneira dependente da dose apresentando  $DI_{50}$  de 0,13 (0,11-0,16) mg/orelha e  $I_{\max}$  de  $97 \pm 2\%$  na dose de 1 mg/orelha. De maneira semelhante o glicocorticoide dexametasona também inibiu a atividade da enzima em  $99 \pm 0,3\%$ , conforme demonstrado na figura 3B.

Uma vez demonstrada a atividade antiinflamatória tópica do extrato de *C. leprosum*, tornou-se interessante investigar a ação do composto isolado TTHL no mesmo modelo. Para tanto foi verificada a atividade do TTHL no edema de orelha induzido por TPA. O triterpeno isolado também foi capaz de inibir a formação do edema, apresentando  $DI_{50}$  de 0,15 (0,08-0,21) mg/orelha e inibição máxima de  $97 \pm 1\%$  (0,6 mg/orelha) (Figura 4A), e ainda promoveu  $99 \pm 0,6\%$  de inibição máxima sobre a atividade da enzima MPO (0,6 mg/orelha) (Figura 4B). Mais uma vez, a dexametasona demonstrou ser capaz de inibir em  $98 \pm 1\%$  e  $99 \pm 0,8\%$  o edema e a atividade enzimática, respectivamente.



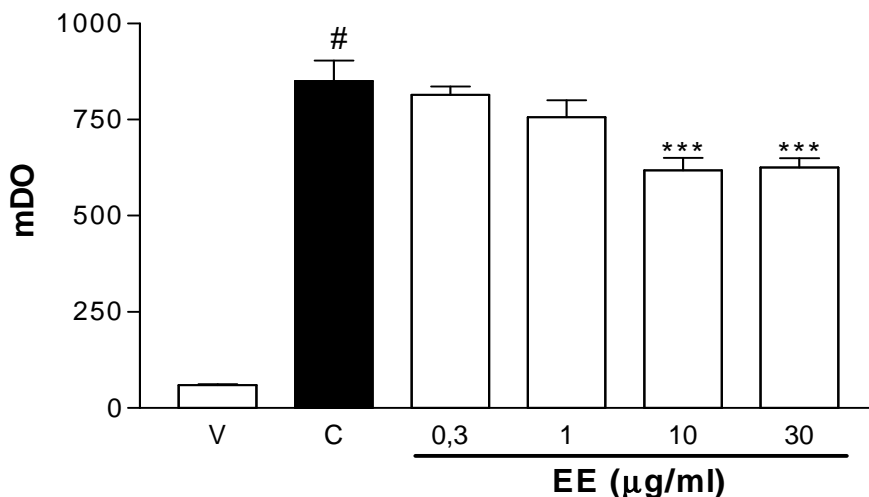
**Figura 3.** Efeito do EE e da dexametasona (dexa) aplicados por via tópica no edema de orelha (A) e na atividade da enzima MPO (B) induzidos pela aplicação de TPA. As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. ( $n=4-10$ ). Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo controle (C) e N representa o grupo não tratado. \* $P<0,05$  e #, \*\*\* $P<0,001$ .



**Figura 4.** Efeito do triterpeno TTHL e da dexta administrados por via tópica no edema de orelha e na atividade da enzima MPO induzidos pela aplicação de TPA. As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. ( $n=4-10$ ). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (C) e N representa o grupo não tratado. \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$  e #, \*\*\* $P<0,001$ .

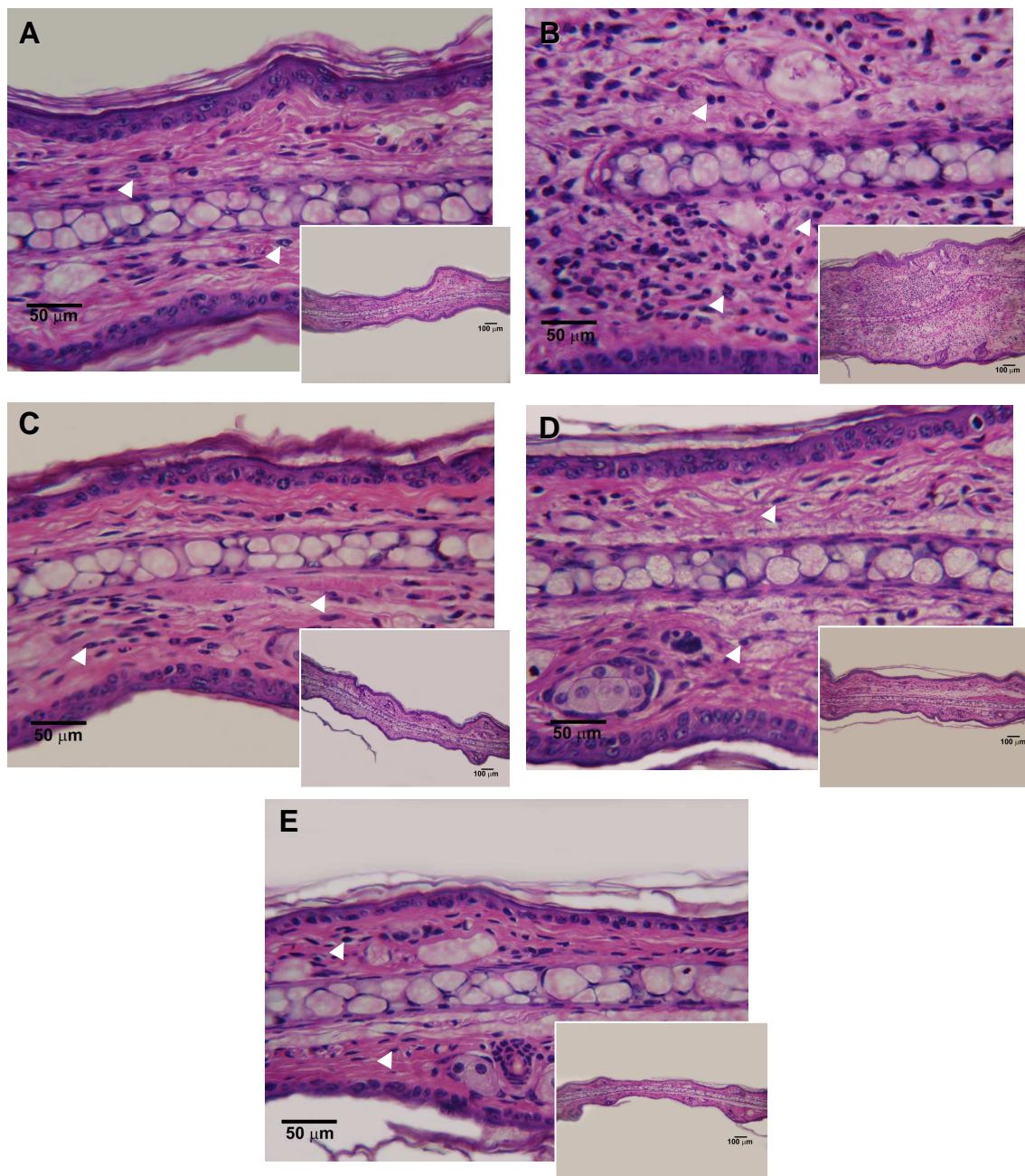
O efeito do EE sobre a atividade da enzima MPO pode ser resultado de uma ação direta sobre a enzima, e não sobre a migração de neutrófilos para o tecido inflamado. Assim, a próxima etapa foi verificar a atividade *in vitro* do EE sobre a enzima MPO. Para tanto, foram coletadas amostras de orelhas expostas ao TPA, e após isolamento da enzima (homogenato) esta foi

incubada com diferentes concentrações do EE. Na figura 5 observa-se que as duas maiores concentrações do extrato foram capazes de inibir diretamente a atividade da enzima MPO.



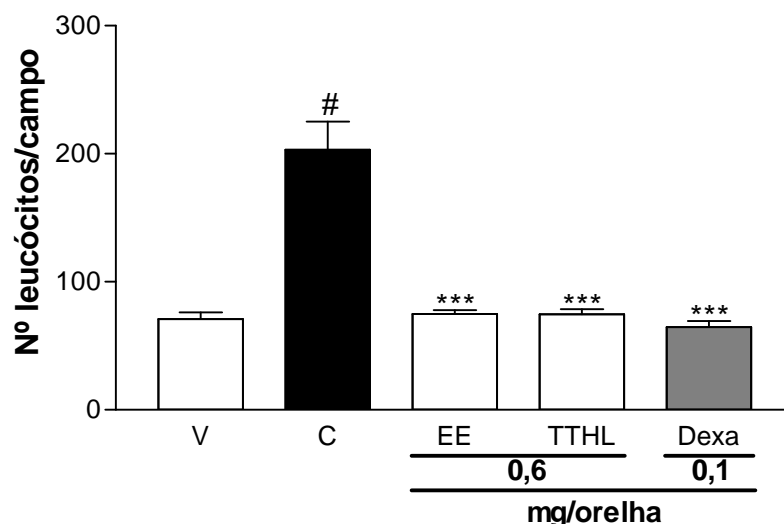
**Figura 5.** Efeito do EE direto sobre a atividade da enzima MPO *in vitro*. Os animais foram desafiados com TPA (C) ou veículo acetona (V). Passadas 6 h foram retiradas amostras (círculos de 6 mm de diâmetro) das orelhas dos animais. Os tecidos foram homogenizados e incubados durante 15 minutos com diferentes concentrações de EE (0,3-30 µg/mL). A atividade enzimática foi quantificada através de leitor de placa (620 nm). As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=4). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (C). #, \*\*\*P<0,001.

Para confirmar o efeito inibitório do EE e do TTHL na inflamação cutânea verificado nos experimentos anteriores, foi realizada a análise histológica. Na figura 6 é possível verificar cortes histológicos representativos das orelhas de camundongos 24 horas após tratamento com TPA. A aplicação tópica do TPA propiciou um importante aumento na espessura da orelha, com clara formação de edema e aumento da infiltração celular na derme. O tratamento com EE ou com TTHL visivelmente reduziu a infiltração celular, apresentando inibição de  $96 \pm 2\%$  e  $97 \pm 3\%$ , de maneira comparável com o controle positivo, dexametasona, o qual promoveu inibição de  $100 \pm 0,4\%$  (Figura 7).



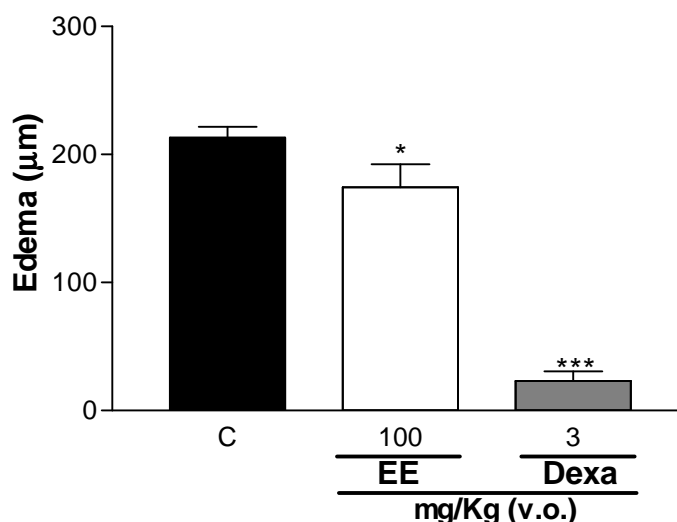
**Figuras 6.** Fotos representativas dos cortes histológicos de orelhas de camundongos corados com hematoxilina-eosina (HE) (400x, escala de 50 μm), 24 horas após aplicação de TPA. (a) veículo, (b) controle, (c) tratamento com EE (0,6 mg/orelha), (d) tratamento com TTHL (0,6 mg/orelha) e (e) dexametasona (0,1 mg/orelha). As setas indicam a presença de leucócitos.





**Figura 7.** Efeito do EE, do TTHL e da dexametasona sobre a migração leucocitária induzida pela aplicação tópica de TPA. A quantificação foi realizada através da contagem dos leucócitos totais com aumento de 400x em cinco campos distintos de quatro cortes histológicos de cada grupo. As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=4). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (C). #, \*\*\*P<0,001.

A fim de se verificar se a atividade antiinflamatória demonstrada pelo EE aplicado topicamente se manteria quando o extrato fosse administrado por via oral, os animais receberam uma dose de 100 mg/Kg do EE meia hora antes da indução do edema com TPA. Conforme evidenciado na figura 8, o EE também foi capaz de diminuir a formação de edema mesmo quando administrado por via oral, inibindo em  $18 \pm 8\%$ , enquanto que a dexametasona causou inibição de  $89 \pm 3\%$ .

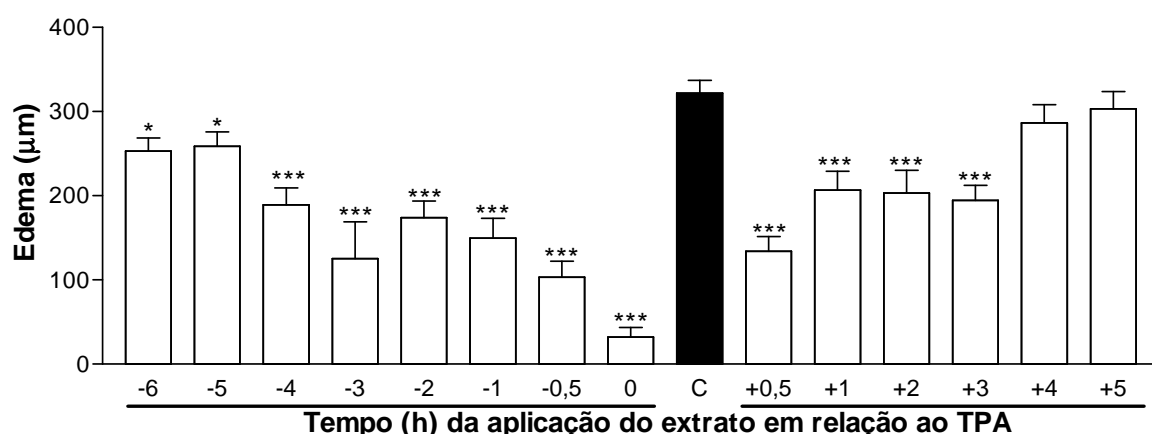


**Figura 8.** Efeito do EE administrado por via oral no edema de orelha induzido pela aplicação tópica de TPA. Os animais foram pré-tratados com EE (100 mg/Kg) ou dexametasona (dexa, 3 mg/Kg) uma hora antes da indução com TPA. As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=4). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (C). \*  $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

#### 4.2. Avaliação curso temporal do efeito do EE sobre o edema de orelha induzido por TPA

A análise curso temporal da resposta do EE contra o edema de orelha induzido por TPA está representada na figura 9. A aplicação tópica do EE (0,6 mg/orelha) reduziu a formação de edema quando o tratamento foi administrado desde 6 horas antes (-6) até 3 horas após (+3) a aplicação do TPA. Quando o extrato foi administrado seis horas antes do estímulo, esse foi capaz de promover inibição de  $21 \pm 5\%$ , sendo que esta resposta tornou-se mais pronunciada conforme o tempo entre tratamento e estímulo foi diminuindo, atingindo um pico quando o EE foi administrado meia hora antes (-0,5) da indução do edema, com inibição de  $68 \pm 6\%$ . Quando a aplicação do EE ocorreu meia hora após (+0,5) a do agente flogístico, o extrato promoveu

inibição de  $58 \pm 5\%$ , a qual diminuiu para  $40 \pm 6\%$  quando o tratamento foi aplicado três horas após (+3) o TPA. Entretanto, a resposta inibitória máxima foi observada quando o extrato foi administrado simultaneamente com o TPA, com inibição de  $90 \pm 4\%$ . Quando aplicado a partir da quarta hora da indução do edema, o extrato já não demonstrou atividade.

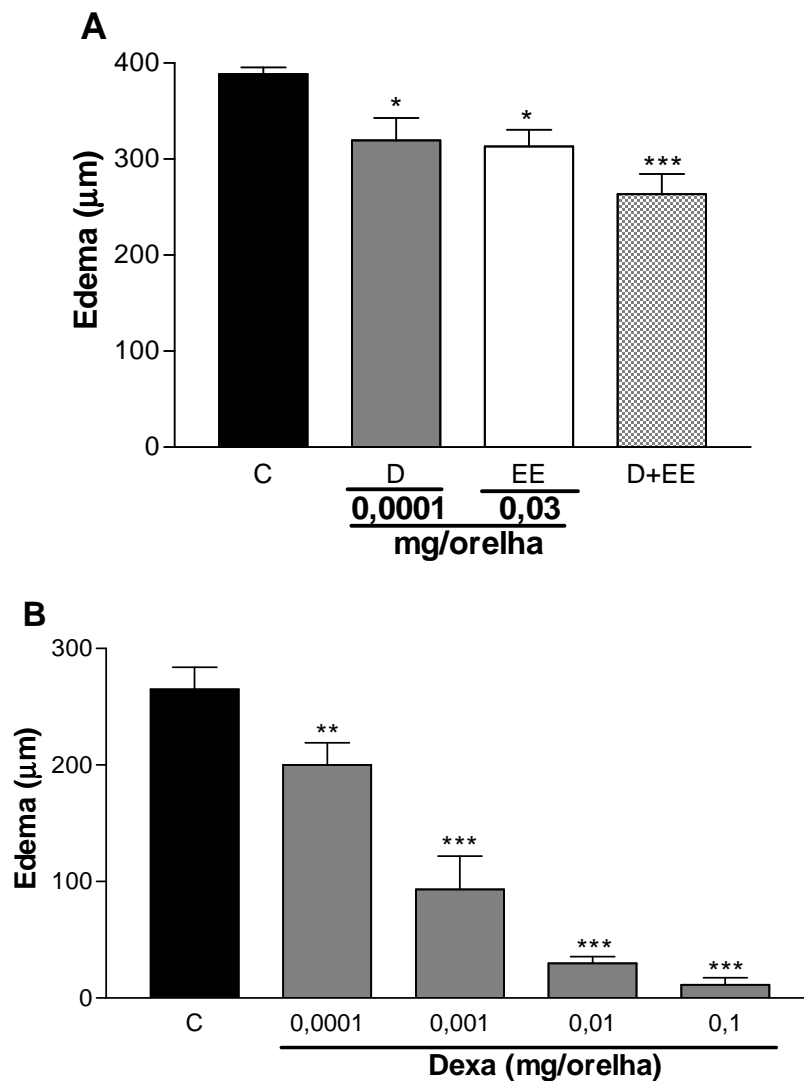


**Figura 9.** Avaliação curso temporal do efeito antiedematogênico tópico do EE. O extrato foi aplicado topicamente em diferentes tempos, antes (-6 à -0,5 h), concomitantemente (0) ou após (+0,5 à +5 h) o TPA. O edema foi verificado seis horas após a indução com TPA. As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=4-8). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (C). \*P<0,05, \*\*\*P<0,001.

#### 4.3. Avaliação do efeito da interação do EE com a dexametasona

Com o intuito de verificar se o EE estaria atuando como um corticóide ou com mecanismo de ação semelhante, foram escolhidas doses efetivas baixas ( $\sim DI_{20}$ ) do EE e da dexametasona, a qual possui  $DI_{50}$  de 0,0006 (0,0005 – 0,0007) mg/orelha (Fig. 10B), e foi realizado um co-tratamento tópico no modelo do TPA. Conforme demonstrado na figura 10A, o co-tratamento com o EE e a dexametasona não promoveu potencialização do efeito inibitório, mas apenas um efeito aditivo. Fazendo a comparação, a administração de apenas

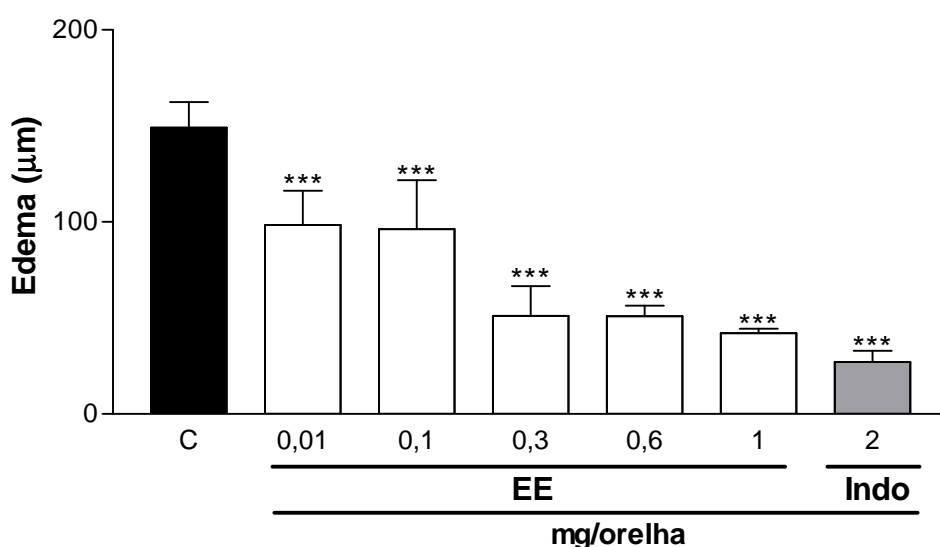
dexametasona inibiu a formação de edema em  $18 \pm 6\%$ , e a de EE inibiu em  $19 \pm 4\%$ , enquanto o co-tratamento causou inibição de  $32 \pm 5\%$ .



**Figura 10.** Efeito da interação entre EE e dexta (D) administrados por via tópica no edema de orelha induzido pela aplicação de TPA (A) e curva dose-resposta da dexta (B). Onde D+EE representa o grupo que recebeu ambos compostos. As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=5). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (C). \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$ .

#### 4.4. Efeito do Extrato Etanólico das Flores de *C. leprosum* (EE) no edema de orelha induzido por AA

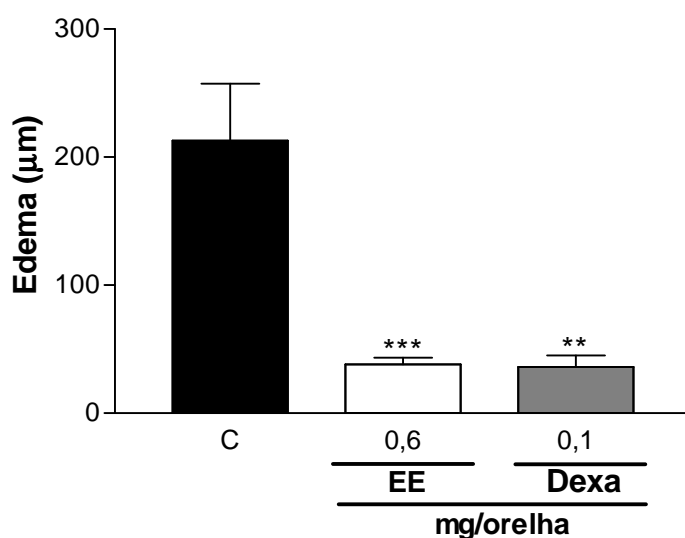
Conforme demonstrado na figura 11, a aplicação tópica de AA promoveu o aumento da espessura das orelhas dos camundongos, o qual foi revertido pela aplicação do EE com  $I_{\max}$  de  $72 \pm 2\%$ . Entretanto o efeito inibitório do extrato não foi dose-dependente, impossibilitando o calculo do valor de  $DI_{50}$ . O controle positivo utilizado no modelo foi a indometacina, a qual também inibiu a formação de edema em  $82 \pm 4\%$ .



**Figura 11.** Efeito do EE e da indometacina (indo) administrados por via tópica no edema de orelha induzido pela aplicação de AA. As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. ( $n=5-10$ ). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (C). \*\*\* $P<0,001$ .

#### 4.5. Efeito do Extrato Etanólico das Flores de *C. leprosum* (EE) no edema de orelha induzido por Fenol

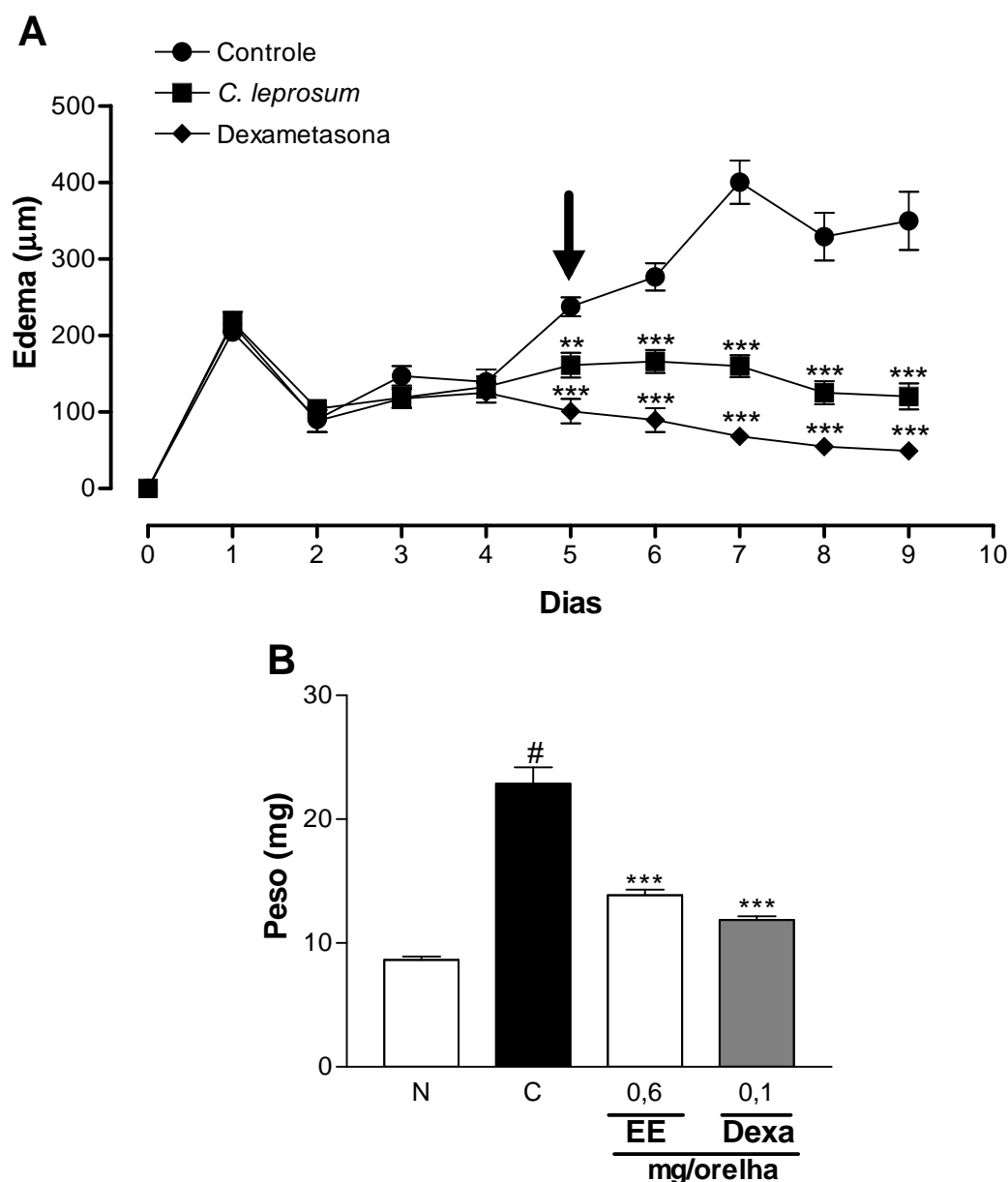
Os resultados apresentados na figura 12 demonstram que a aplicação tópica de fenol é capaz de promover edema de orelha em camundongos, e que a aplicação do EE (0,6 mg/orelha) foi capaz de reverter esse processo, da mesma maneira que o controle positivo dexametasona, apresentando inibição de  $82 \pm 3\%$  e  $83 \pm 4\%$ , respectivamente.



**Figura 12.** Efeito do EE e da dexa administrados por via tópica no edema de orelha induzido pela aplicação de fenol. As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=5-10). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (C). \*\*P<0,01 e \*\*\*P<0,001.

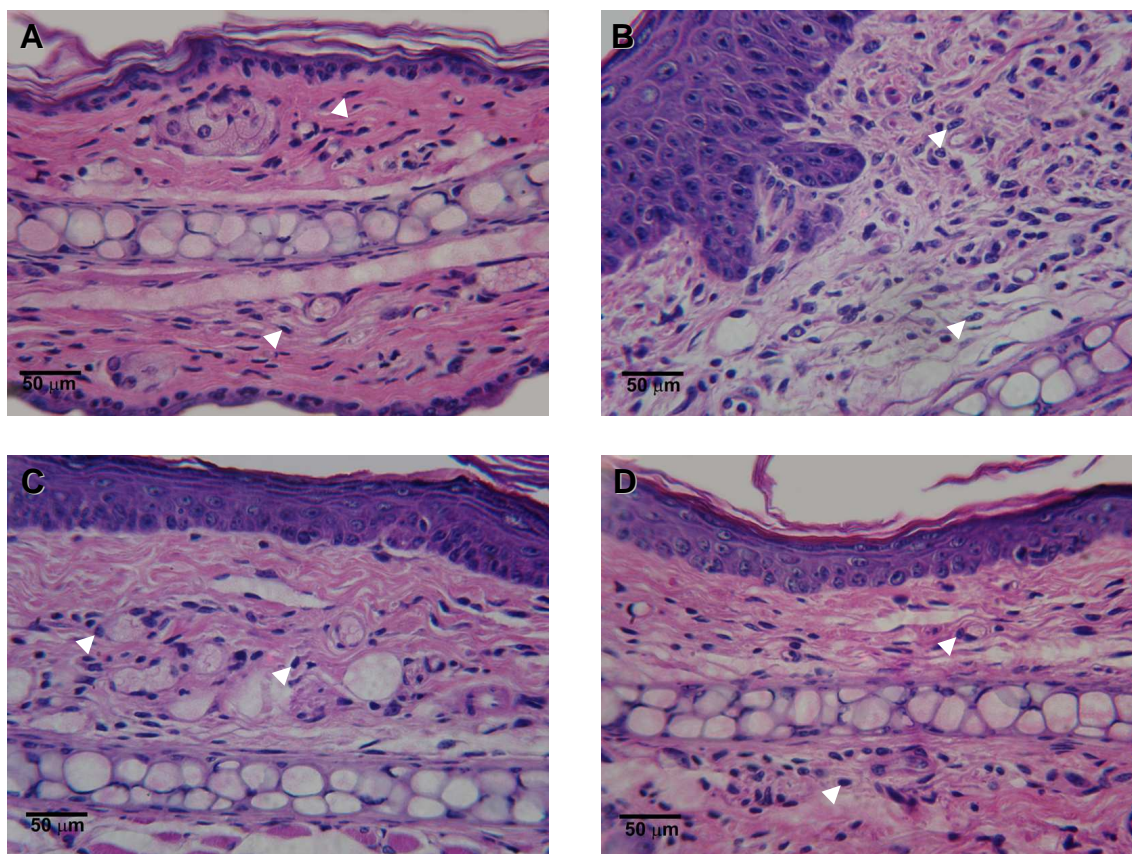
#### 4.6. Efeito do Extrato Etanólico das Flores de *C. leprosum* (EE) no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de Óleo de Cróton

O edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton é um modelo que mimetiza um processo inflamatório crônico apresentando características como edema, infiltrado de células mononucleares predominantemente e hiperproliferação da epiderme (STANLEY et al.,1991). Na figura 13A é possível observar que após o estabelecimento do processo inflamatório, tanto o EE quanto a dexametasona reverteram a formação do edema desde o início do tratamento, apresentando inibição de  $66 \pm 5\%$  e  $86 \pm 3\%$ , respectivamente, no 9º dia. Os dados da figura 13B confirmam que o processo instalado provoca edema evidenciado também pelo peso das orelhas, sendo que o EE e a dexametasona reverteram o aumento no peso, com inibição de  $63 \pm 3\%$  e  $77 \pm 2\%$ , respectivamente.



**Figura 13.** Efeito do EE no edema induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton. O processo inflamatório crônico foi induzido com a aplicação tópica de óleo de cróton (0,4 mg/orelha) em dias alternados durante 9 dias. O EE (0,6 mg/orelha) e a dexametasona (0,1 mg/orelha) foram aplicados topicamente durante 4 dias (2 vezes ao dia) após o quinto dia do início da aplicação do óleo de cróton e a espessura da orelha medida diariamente (A). No último dia de tratamento amostras das orelhas foram coletadas e pesadas (B). Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM ( $n=10$ ). \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$  representam o nível de significância em relação ao controle (C) e N representa o grupo não tratado.

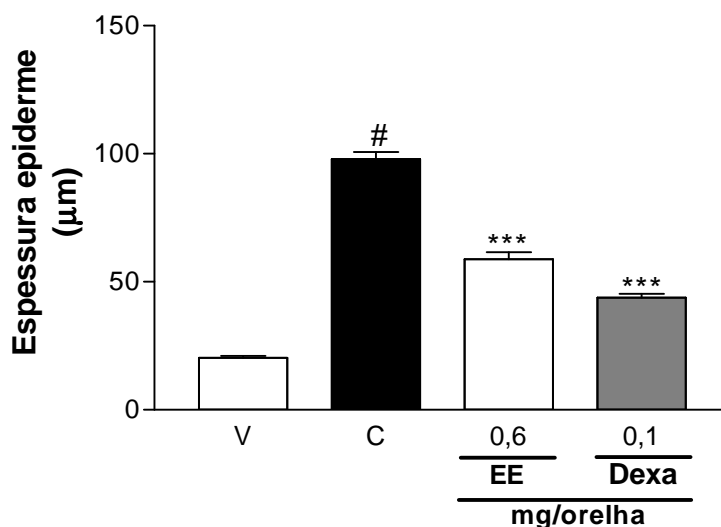
A análise histológica do tecido das orelhas após o tratamento repetido com TPA (Figura 14) permite a avaliação da hiperproliferação dos queratinócitos epidérmicos (aumento na espessura da epiderme), assim como da migração leucocitária.



**Figura 14.** Fotos representativas dos cortes histológicos de orelhas de camundongos corados com HE (400x, escala de 50 µm) após aplicação repetida de OC. (a) veículo, (b) controle, (c) tratamento com EE (0,6 mg/orelha), e (d) dexametasona (0,1 mg/orelha). As setas indicam a presença de leucócitos.

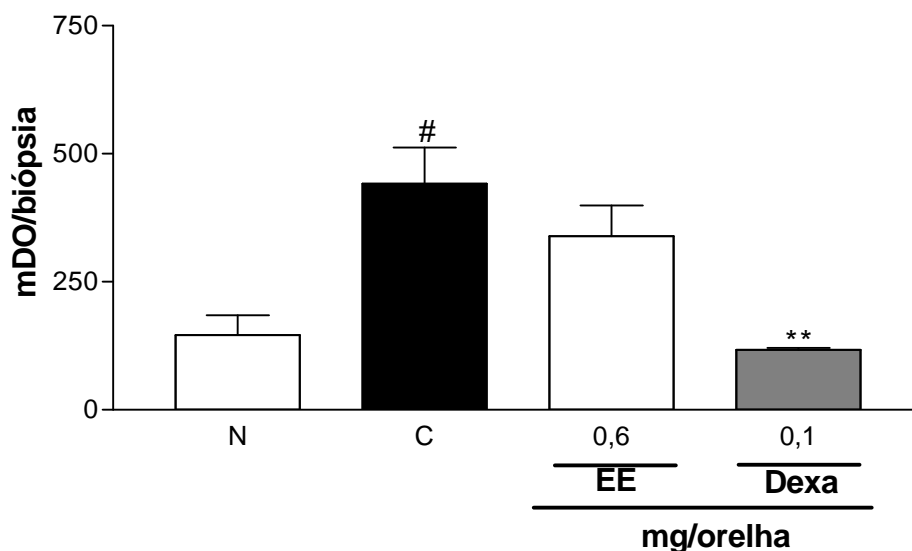
Como demonstrado na figura 15, a aplicação múltipla de óleo de cróton provocou um aumento de aproximadamente cinco vezes a espessura da epiderme. Mais uma vez o EE e a dexametasona foram efetivos, agora inibindo a hiperproliferação epidérmica em  $50 \pm 4\%$  e  $70 \pm 2\%$ , respectivamente.



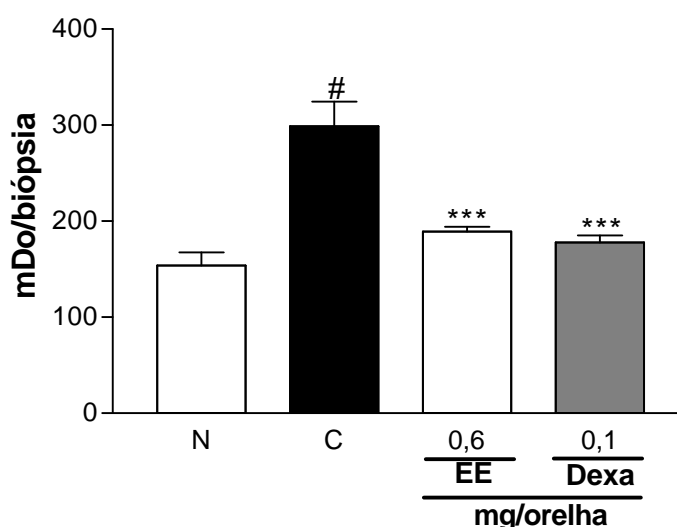


**Figura 15.** Efeito do etanólico das flores de *C. leprosum* (EE) sobre a hiperproliferação epidérmica no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM (n=10). \*\*\*p< 0,001; representam o nível de significância em relação ao controle (C) e V representa o grupo tratado somente com o veículo.

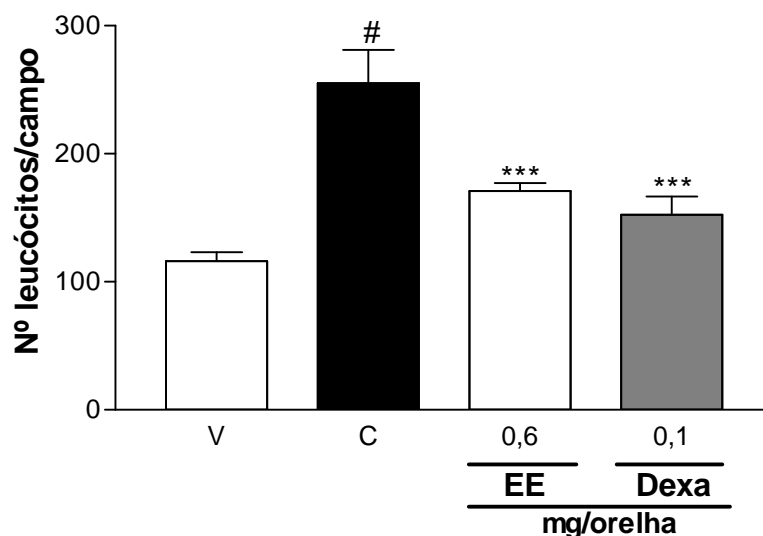
Com relação a migração de neutrófilos, o tratamento com EE não foi capaz de modificar a atividade da MPO (Figura 16), ao contrário da dexametasona que promoveu inibição total do aumento da atividade dessa enzima. Entretanto, o EE inibiu a atividade da enzima NAG, assim como a dexametasona, causando inibição de  $76 \pm 4\%$  e  $83 \pm 5\%$ , respectivamente (Fig. 17). A inibição da infiltração celular foi confirmada pela quantificação de leucócitos na derme através de análises histológicas, sendo que o EE e a dexametasona reduziram a quantidade de células infiltradas em  $61 \pm 4\%$  e  $74 \pm 10\%$ , respectivamente (Fig. 18).



**Figura 16.** Efeito do EE e da dexta aplicados por via tópica na atividade da enzima MPO induzidos pela aplicação múltipla de OC. As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=4). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (C) e N representa o grupo não tratado. \*\*P<0,01 e #P<0,001.

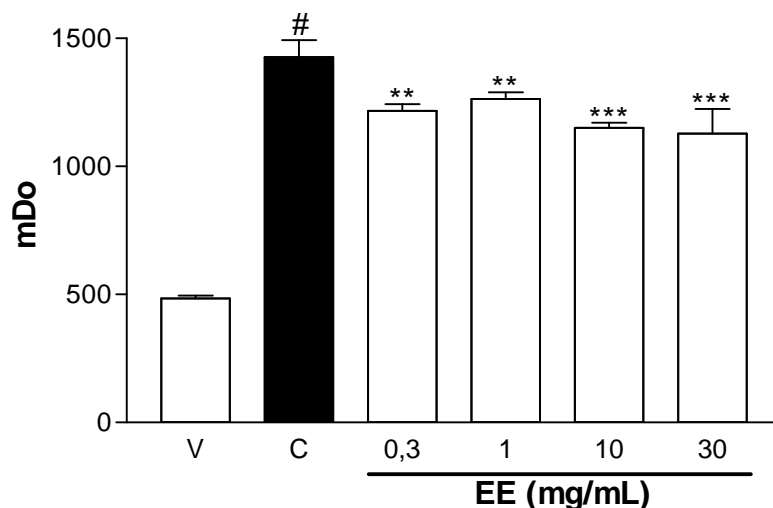


**Figura 17.** Efeito do EE e da dexta aplicados por via tópica na atividade da enzima NAG induzidos pela aplicação múltipla de OC. As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=4). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (C) e N representa o grupo não tratado. #,\*\*\*P<0,001.



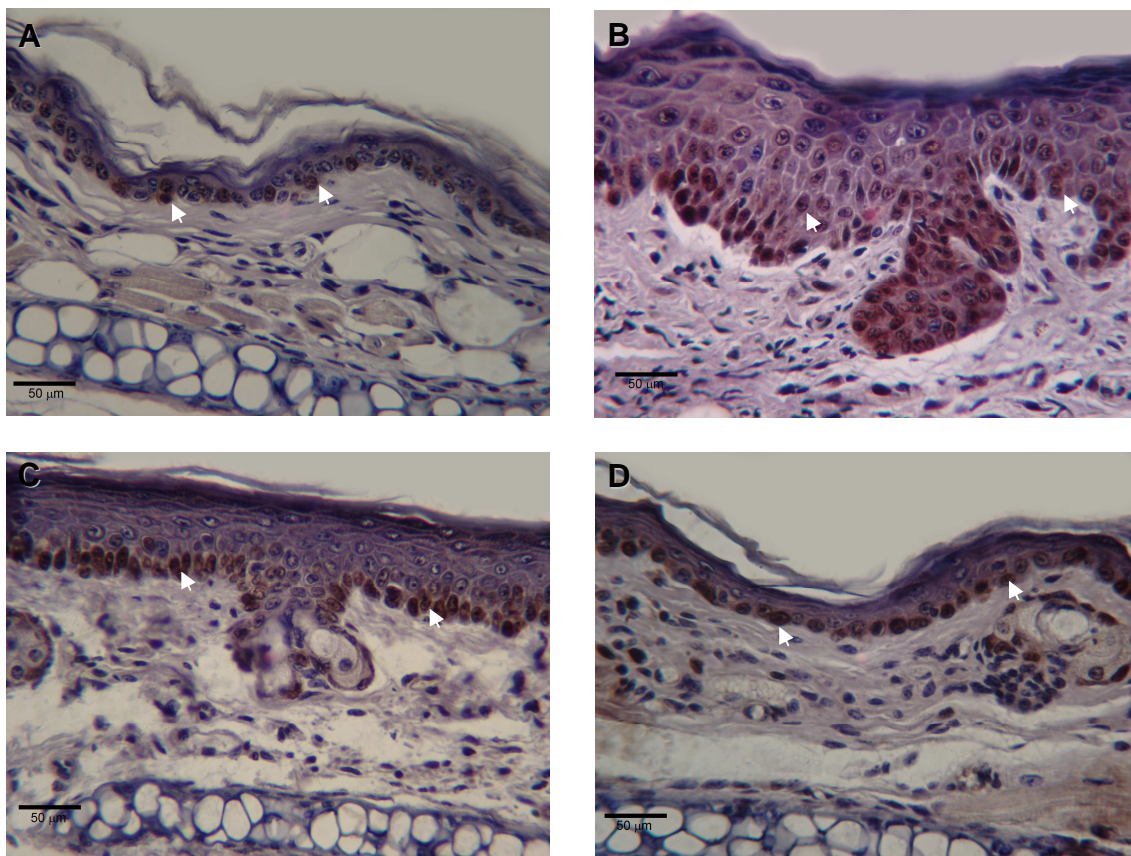
**Figura 18.** Efeito do EE e da dexta sobre a migração leucocitária induzida pela aplicação múltipla de OC. A quantificação foi realizada através da contagem dos leucócitos totais com aumento de 400x em cinco campos distintos de quatro cortes histológicos de cada grupo. As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=4). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (C). #, \*\*\*P<0,001.

Assim como ocorrido com a enzima MPO, o extrato poderia estar interagindo diretamente com a enzima NAG. Para verificar se parte da inibição da atividade da NAG estaria ocorrendo de maneira direta, foram coletadas amostras de orelhas submetidas à exposição crônica de OC sem, entretanto, receber tratamento. O homogenato dessas orelhas foi incubado com diferentes concentrações de EE. Conforme observado na figura 19, o EE foi capaz de alterar a atividade da enzima NAG diretamente, de maneira não dependente da concentração.

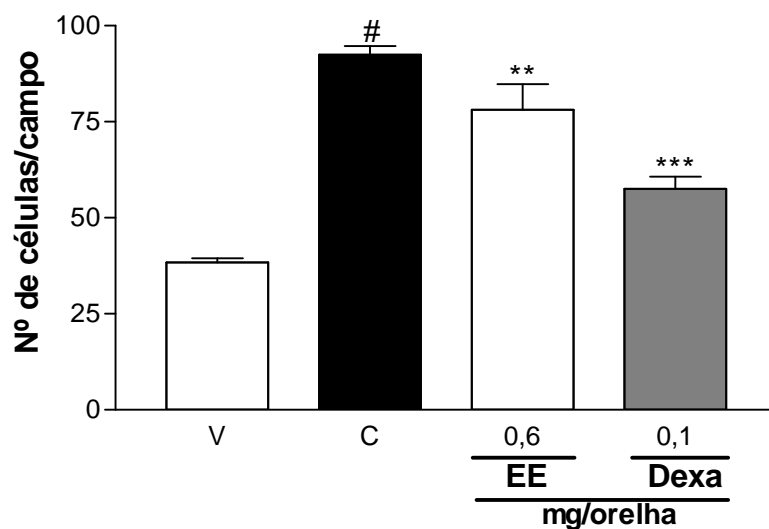


**Figura 19.** Efeito do EE sobre a atividade da enzima NAG *in vitro*. Os animais foram tratados cronicamente com OC (C), com exceção do grupo veículo que recebeu apenas a aplicação de acetona (V). Amostras de 6 mm de diâmetro das orelhas dos animais de cada grupo foram homogeneizadas e incubadas durante 15 minutos com diferentes concentrações de EE (0,3-30 µg/mL). A atividade enzimática foi quantificada através de leitor de placa (620 nm). As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=4). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (C). \*\*P<0,01, #,\*\*\*P<0,001.

A fim de verificar se o extrato estaria influenciando diretamente na proliferação celular da epiderme induzida pela aplicação repetida de OC, foi realizada a técnica de imunohistoquímica com marcação do PCNA, o qual é um marcador das células que estão em processo de proliferação. Conforme observado na figura 20, em todos os grupos foram detectadas células positivas para PCNA como indicativo de que estas estavam proliferando. Entretanto no grupo veículo o número de células é pequeno indicando uma proliferação basal baixa, o que é normal. O tratamento crônico com OC propiciou o aumento no número de células em proliferação inclusive com o aparecimento de células proliferativas fora da camada basal. Esse aumento pode ser diminuído tanto pelo extrato como pela dexametasona com inibições de  $27 \pm 12\%$  e  $65 \pm 6\%$ , respectivamente (Figura 21).



**Figura 20.** Fotos representativas da análise imunohistoquímica dos cortes histológicos de orelhas de camundongos, contra corados com HE (400x, escala de 50  $\mu$ m), após aplicação de tratamento crônico com OC. (a) veículo, (b) controle, (c) tratamento com EE (0,6 mg/orelha), e (d) dexametasona (0,1 mg/orelha). As células coradas em marrom são positivas para PCNA, conforme exemplos indicados pelas setas.



**Figura 21.** Efeito do EE e da dexametasona sobre a hiperproliferação epidermal induzida pela aplicação múltipla de OC. A análise foi feita através de imunohistoquímica e a quantificação realizada através da contagem das células positivas para PCNA com aumento de 400x em cinco campos distintos de quatro cortes histológicos de cada grupo. As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=4). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle (C). \*\*P<0,001, #, \*\*\*P<0,001.

**DISCUSSÃO**

---

## 5. DISCUSSÃO

O gênero *Combretum* possui diversas espécies que são constantemente utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversos males, sendo comumente encontrados entre esses, distúrbios onde processos inflamatórios estão envolvidos. Tendo em vista a grande utilização popular dessas espécies, alguns pesquisadores têm se interessado em investigar cientificamente, as propriedades biológicas dessas plantas e de seus compostos, e esses estudos têm sugerido para muitas dessas espécies, atividade antiinflamatória.

Em seu trabalho, Ojewole (2008) investigou as atividades biológicas de uma saponina triterpênica extraída das folhas de *C. molle*, ácido mólico glicosídeo. O composto demonstrou atividade analgésica quando testado nos modelos de placa quente e de contorções por ácido acético. Além disso, foi capaz de reverter a formação de edema no modelo de edema de pata induzido pela injeção intraplantar de albumina, demonstrando atividade antiinflamatória.

Outros trabalhos demonstram atividade antiinflamatória através da capacidade de impedir a síntese de PG através da inibição da enzima COX. Entre estes está o trabalho de Eldeen et al. (2005) onde o extrato de *C. kraussii* foi capaz de inibir a formação de PG via COX. Em outro trabalho, onde foram testados oitenta diferentes extratos de espécies de *Combretum*, quinze mostraram possível atividade antiinflamatória ao inibir a síntese de PG pela ação em COX-1, principalmente os extratos das espécies *C. apiculatum*, *C. imberbe*, *C. molle* e *C. mossambicense* (MCGAW et al., 2001).

Alguns estudos realizados previamente com a espécie *Combretum leprosum* ou mofumbo, sugerem que esta planta realmente possui atividade antiinflamatória. O estudo mais completo acerca de suas atividades biológicas objetivou verificar a atividade antinociceptiva do EE em diferentes modelos animais. Além do efeito analgésico do extrato, os resultados obtidos nessa pesquisa forneceram fortes indícios da atividade antiinflamatória de *C. leprosum* uma vez que o EE foi capaz de inibir a nocicepção em modelos com componentes inflamatórios. Um desses modelos é o teste de formalina, onde o extrato foi eficaz inclusive na fase inflamatória do processo. Outro modelo em que o extrato demonstrou atividade foi o teste de contorções abdominais



induzidas por ácido acético, um modelo tipicamente utilizado no rastreamento de novos agentes antiinflamatórios (PIETROVSKI et al., 2006).

Outro estudo bastante importante é o trabalho de Facundo et al. (2005), onde os autores demonstraram a atividade antiinflamatória do extrato etanólico das raízes de *C. leprosum*, quando administrado por via oral no modelo de edema de pata induzido pela aplicação intraplantar de carragenina. Ainda nesse trabalho, foi testado o triterpeno isolado desse extrato, o ácido arjunólico, o qual foi capaz de inibir a formação de edema, quando administrado, também por via oral, no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação tópica de AA (FACUNDO et al., 2005).

Esses estudos auxiliam na justificativa do uso popular dessa planta, entretanto, muito pouco foi investigado a respeito das propriedades antiinflamatórias dessa espécie e dos compostos dela isolados. Além disso, a *C. leprosum*, assim como outras espécies do gênero, é muito utilizada no tratamento tópico de distúrbios dermatológicos, entretanto até o momento nenhum trabalho havia demonstrado sua eficácia quando administrada por via tópica. No presente trabalho, os resultados comprovam que essa espécie possui atividade antiinflamatória e ainda que o extrato também possui ação tópica, uma vez que tanto o EE como o triterpeno isolado foram eficazes em diminuir parâmetros inflamatórios, como edema e migração celular no modelo de edema de orelha induzido por TPA, quando aplicados topicamente.

A aplicação tópica de TPA é considerada um modelo válido na busca de compostos que sejam eficazes como antiinflamatórios tópicos. Quando aplicado topicamente na pele de camundongos, o TPA promove indução de estresse oxidativo ou produção de espécies reativas de oxigênio, inflamação cutânea e subsequentemente pode ocorrer hiperplasia epidermal (RAHMAN et al., 2008). O TPA é um dos principais ésteres de forbol presentes no óleo de cróton, que por sua vez é uma mistura de lipídios extraídos da espécie *Croton tiglium* L. (Euphorbiaceae) conhecida por sua atividade flogística. A aplicação tópica desse agente está associada com resposta inflamatória, estresse oxidativo, proliferação e ativação de oncogenes nucleares. O TPA por via tópica gera uma resposta inflamatória aguda que apresenta vasodilatação, infiltração de leucócitos polimorfonucleares para o tecido e formação de edema (GARG et al., 2008; GARBOR, 2000). De acordo com estudos que buscam

elucidar o mecanismo de ação do TPA na pele de camundongos, a aplicação deste agente promove alteração de diversos processos incluindo crescimento, diferenciação e morte celular, além da resposta inflamatória. Todos esses efeitos parecem ser provenientes da ativação direta da PKC. Embora uma variedade de cascatas de sinalização intracelulares seja ativada em resposta ao TPA, parece que o primeiro local de ação desse éster de forbol é a membrana celular onde ativa a PKC por mimetizar seu ativador natural, o diacilglicerol, ligando-se em sítios específicos de seu domínio regulatório (GARG et al., 2008). Assim, o tratamento com TPA promove o aumento da atividade da PKC e sua ativação gera conseqüentemente um aumento na atividade da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), aumentando a liberação de ácido araquidônico dos fosfolipídios de membrana, o que leva ao subsequente aumento de seus metabólitos como leucotrienos e prostaglandinas (GARG et al., 2008). Esses metabólitos são conhecidos por agirem como mediadores das vias inflamatórias desencadeadas pela atividade das enzimas COX e lipoxigenase (LOX). Produtos do metabolismo do AA como prostaciclina e leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) agem de forma a aumentar a permeabilidade vascular, o que sustenta a formação de edema durante o processo inflamatório (BRALLEY et al., 2007; GARBOR, 2000). Portanto, nesse modelo o edema está intimamente associado com o aumento no conteúdo de eicosanóides como PG e LTB<sub>4</sub>. Assim, não só os inibidores de COX e LOX, mas também os antagonistas de LTB<sub>4</sub> são capazes de inibir o edema induzido por TPA. Isso sugere que os eicosanóides possuem importante função na inflamação de pele induzida por TPA (MURAKAWA et al., 2006).

Além da indução da produção de eicosanóide, o TPA induz também, a expressão de citocinas inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , as quais participam ativamente no processo inflamatório cutâneo como peças centrais (MURAKAWA et al., 2006; LEE et al., 2009). A IL-1 $\beta$  ativa uma via que irá resultar na transcrição de uma série de genes que levarão a expressão de diversas moléculas importantes para o processo inflamatório como moléculas de adesão, quimiocinas, citocinas secundárias, a enzima óxido nítrico sintase e ciclooxigenase (OTUKI et al., 2005). O TNF- $\alpha$  também é responsável pela indução da expressão de diversos genes que irão sustentar a resposta inflamatória cutânea. Além disso, o TNF- $\alpha$  ativa a via de sinalização de

transdução que irá ativar o NF- $\kappa$ B, o que leva um “feedback” pro inflamatório positivo (AMIGÓ et al., 2007).

O TPA também promove o aumento da expressão da enzima COX-2 a qual é responsável por catalisar a biosíntese das PG. A expressão de COX-2 induzida pela aplicação de TPA é regulada por diferentes fatores de transcrição incluindo NF- $\kappa$ B e AP-1. Estudos demonstram que a aplicação tópica de TPA facilita a translocação nuclear e a ligação ao DNA do NF- $\kappa$ B, através da fosforilação do I $\kappa$ B. Essa fosforilação, por sua vez, é mediada por proteínas quinases como I $\kappa$ B quinase (IKK), quinase reguladora de sinal extracelular (ERK) 1/2 ou p38 MAPK (KUNDU et al., 2009). A transcrição de citocinas como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e muitos outros efetores como moléculas de adesão e enzimas, é regulada pelo fator de transcrição NF- $\kappa$ B (DE VRY et al., 2005). A atividade transcricional do NF- $\kappa$ B é regulada por uma série de eventos de transdução e sinalização intracelular, bastante elaborados, sendo que p38 MAPK e ERK parecem ser as principais quinases reguladoras da ativação do NF- $\kappa$ B (PARK et al., 2008). Assim, compostos capazes de inibir a atividade das enzimas PLA<sub>2</sub>, COX e LOX, antagonizar os efeitos dos eicosanóides, bloquear a ativação de fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B ou modular a atividade de quinases como MAPK e ERK1/2, podem ser identificados nesse modelo, uma vez que são capazes de diminuir ou inibir o processo inflamatório induzido por TPA (KUNDU et al., 2009). Ao inibir o edema de maneira dependente da dose nesse modelo, o extrato está provavelmente interagindo especificamente com alguma dessas vias acima descritas e pode, portanto, ser um interessante alvo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos antiinflamatórios (GARBOR, 2000; RODRIGUES SILVA et al., 2008).

Além de o EE ter demonstrado um efeito dependente da dose, sua atividade também variou de acordo com o momento em que este foi administrado em relação a administração do TPA. Na avaliação curso temporal do efeito antiedematogênico, o extrato apresentou um efeito duradouro de pelo menos doze horas. Além disso, o extrato demonstrou ser eficaz como agente profilático e de maneira mais interessante, uma ótima opção como tratamento após o estabelecimento do processo inflamatório. A extensa faixa de tempo envolvida no início e duração do efeito sugere que este extrato possui um ou mais compostos ativos que possivelmente estariam interferindo em diferentes

estágios da cascata de sinalização inflamatória, contra diferentes mediadores inflamatórios ao longo de diversos alvos. As duas possibilidades representam uma importante característica na busca por agentes mais potentes que apresentem menos efeitos colaterais. Embora o EE tenha sido efetivo quando administrado em diferentes tempos, o melhor efeito foi visualizado quando este foi administrado ao mesmo tempo em que o estímulo, o que sugere que algum componente do extrato pode estar atuando logo nos primeiros eventos do processo inflamatório (GABOR, 2000).

A infiltração celular é outra característica bastante marcante da resposta inflamatória cutânea induzida pela aplicação de TPA. O acúmulo de neutrófilos é uma característica importante de diversas doenças inflamatórias cutâneas, sendo que a estimativa da quantidade dessas células no tecido inflamado pode ser útil como indicativo da severidade do processo inflamatório, ou ainda pode servir para verificar o efeito de novas ferramentas capazes de alterar o processo inflamatório ou alterar a migração dessas para a pele (BRADLEY et al., 1982). Os granulócitos neutrófilos são considerados a primeira linha de defesa contra microorganismos invasores sejam estes bactérias, vírus ou fungos. Além de outros mecanismos utilizados nesse combate, os neutrófilos geram componentes reativos do oxigênio os quais desempenham importante função na defesa (ARATANI et al., 1999).

A MPO é uma enzima catiônica possuidora de um grupamento heme e que é encontrada principalmente nos grânulos azurofílicos de neutrófilos, mas também, em menor proporção nos lisossomos primários de monócitos. Em neutrófilos que são ativados por quimioatratantes, onde a MPO é a enzima mais abundante, uma vez liberada pelos grânulos azurofílicos primários, esta participa como peça chave na defesa do hospedeiro contra infecções microbianas. Na presença de íons cloro ( $\text{Cl}_2$ ), a MPO transforma o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) formado durante o metabolismo oxidativo, em ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ), o qual é considerado um oxidante altamente citotóxico. É uma vez que o  $\text{HOCl}$  é produzido no interior dos fagossomos, estes tornam-se uma potente arma contra patógenos (ARATANI et al., 1999; GUILPAIN et al., 2008).

Esse sistema  $\text{MPO-H}_2\text{O}_2\text{-Cl}_2$  parece ser uma importante ferramenta utilizada pelos neutrófilos para matar microorganismos. Além disso, esse

sistema parece estar envolvido na citotoxicidade contra células cancerígenas, mas também no dano tecidual causado em locais inflamados onde os neutrófilos podem liberar tanto MPO como  $H_2O_2$ . Diversos efeitos do HOCl contribuem para o dano tecidual causado por neutrófilos em focos inflamatórios, entre esses efeitos deletérios estão a inativação de enzimas e oxidação de aminoácidos susceptíveis. A MPO também catalisa a formação de hipotiocianato, promove a oxidação de grupamentos como fenol e anilina. Além do mais, a MPO também exerce efeitos diretos sobre as células endoteliais, uma vez que essas células internalizam a enzima, esta é responsável pela produção intracelular de oxidantes. Esse efeito pode contribuir para o aumento do dano tecidual em focos inflamatórios. Assim, a MPO vem sendo associada a diversas condições patológicas, especialmente aquelas onde existe um processo inflamatório mediado por neutrófilos, como artrite reumatóide, asma e câncer (ARATANI et al., 1999; GUILPAIN et al., 2008).

Já é bem estabelecido que o nível de atividade dessa enzima é diretamente proporcional a concentração de neutrófilos no tecido inflamado, sendo a medida da atividade da enzima considerada um sensível marcador quantitativo da quimiotaxia e da infiltração de neutrófilos no processo inflamatório. Então, ao inibir a migração de neutrófilos, ou ainda a atividade da enzima, pode ocorrer diminuição do dano tecidual causado por enzimas hidrolíticas e também por algumas espécies oxidativas (GARRIDO et al., 2004). Assim, tanto o EE quanto o TTHL diminuíram a atividade da enzima MPO, sugerindo uma possível interferência na migração celular. Entretanto, parte do efeito sobre a MPO ( $28 \pm 3\%$ ) parece ser pela ação direta na enzima, como verificado no teste *in vitro*. O restante do efeito inibitório do EE sobre a MPO deve ser decorrente da ação sobre a migração dos neutrófilos.

A atividade da MPO e o sistema formado junto com seus produtos são de extrema importância na defesa do hospedeiro contra infecções. Entretanto, sobre condições patológicas, a ativação persistente do sistema MPO- $H_2O_2$  em fagócitos ativados podem afetar os tecidos adversamente. O HOCl é capaz de iniciar reações de modificações focando lipídios, DNA e lipoproteínas, incluindo reações de halogenação, nitração e “cross-linking” oxidativo (MALLE et al., 2007). O desenvolvimento de estratégias de intervenção terapêutica tem como objetivo uma inibição eficiente da MPO podendo ser efetiva em diferentes

níveis, como com o bloqueio de seu sítio ativo, desvio da MPO do ciclo de cloritização, inibição irreversível com o uso de inibidores suicidas e aplicação de seqüestradores do HOCl para prevenir o início e propagação de doenças onde componentes inflamatórios estejam envolvidos. Todas essas estratégias vêm sendo seguidas, mas ainda de maneira limitada e não sistemática. O que se sabe é que inibindo a atividade da enzima MPO, obtém-se a melhora dos efeitos adversos oxidativos gerados pela MPO. Assim, um composto, como o EE que é capaz de inibir diretamente a atividade da MPO é de extremo interesse (MALLE et al., 2007).

Mesmo o EE sendo capaz de inibir a atividade da MPO *in vitro*, esse efeito foi menos pronunciado do que o observado no experimento *in vivo*, sugerindo que a inibição direta da enzima parece não ser o único mecanismo envolvido. Tornando-se necessária uma melhor investigação acerca da possível influencia do extrato sobre a infiltração de PMN. Sendo assim, o efeito do EE na migração celular foi confirmado através de análises de cortes histológicos, obtidos após indução do processo inflamatório com TPA, onde a contagem dos leucócitos totais demonstrou a capacidade do extrato e também do triterpeno em inibir a migração celular. Nesses cortes histológicos também foi possível observar de maneira bastante evidente a inibição da formação do edema, confirmando também esta ação do EE.

Entre os compostos isolados de espécies pertencentes ao gênero *Combretum* são bastante comuns os triterpenos. Diversos estudos investigando as possíveis atividades biológicas desses compostos têm fornecido informações interessantes. Um exemplo é o estudo de Angeh et al. (2007), onde foi testada a atividade antimicrobiana e antiinflamatória de cinco triterpenos diferentes, isolados da espécie *C. imberbe*. Todos os triterpenos testados foram eficazes contra os microorganismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e dois deles demonstraram atividade antiinflamatória. Dois outros estudos bastante importantes descrevem a atividade antiinflamatória tópica da  $\alpha$ -amirina, um triterpeno pentacíclico isolado da espécie *Protium kleinii*, o qual demonstrou uma acentuada e rápida inibição do processo inflamatório induzido por TPA inibindo a formação de edema e migração de PMN em orelha de camundongos. Além disso, o composto foi capaz de suprimir os níveis de PGE<sub>2</sub> e IL-1 $\beta$ , a expressão de COX-2, inibir as quinases

ERK, p38 MAPK e PKC $\alpha$  e ainda bloquear a ativação de NF-kB (OTUKI et al., 2005; MEDEIROS et al., 2007).

A literatura, portanto, sugere que triterpenos isolados das espécies de *Combretum* são possuidores de atividades farmacológicas importantes, o que nos levou a testar o TTHL apesar deste não ser o principal princípio ativo dessa planta. O ácido arjunólico é o composto majoritário isolado de *C. leprosum* e tem sido investigado em diversos estudos, onde demonstrou propriedades antinociceptiva e antiinflamatória (FACUNDO et al., 2005). O triterpeno TTHL foi isolado posteriormente e talvez por isso tenha sido menos estudado. O trabalho mais importante envolvendo esse composto descreve este como o responsável, pelo menos em parte, pela atividade antinociceptiva demonstrada pelo extrato (PIETROVSKI et al., 2006). Nossos resultados demonstraram que esse triterpeno possui atividade antiinflamatória tópica uma vez que inibiu de forma bastante significativa o edema e o influxo celular causados pela aplicação tópica de TPA. Esses resultados corroboram com os trabalhos de outros autores (OJEWOLE, 2008b; ANGEH et al., 2007) que atribuem atividades biológicas importantes aos demais compostos isolados dessa planta e de outras do mesmo gênero e ainda sugere que o TTHL seja responsável, pelo menos em parte pelos efeitos antiinflamatórios tópicos do EE.

Da mesma forma que a administração tópica, a administração oral do extrato também foi capaz de promover a inibição do processo inflamatório cutâneo, o que já era de se esperar uma vez que a literatura demonstra atividade biológica deste extrato mesmo quando administrado por via oral (PIETROVSKI et al., 2006). Entretanto, por essa via o extrato mostrou-se menos eficaz, o que pode ser justificado pelo fato de que quando administrado topicamente, a concentração dos compostos com atividade antiinflamatória disponível no local de interesse é muito maior (GARBOR, 2000). Assim, a escolha da via de administração é de grande importância para o sucesso de um tratamento e no caso de problemas cutâneos a via tópica parece ser bastante interessante, assim como a planta é utilizada popularmente.

Outro efeito importante demonstrado pelo extrato foi a inibição do edema promovido pela aplicação tópica de AA. O AA é conhecido por ser metabolizado, no interior do organismo em substâncias envolvidas no processo inflamatório através da atividade de duas enzimas principais COX e LOX. A via

metabólica da COX resulta na formação de PGs, metabólitos com propriedades vasodilatadoras. Enquanto que a via da LOX é por sua vez encontrada em células responsáveis por respostas inflamatórias, como mastócitos e eosinófilos (EPPLER et al., 2007).

A enzima COX-2 também utiliza o AA como substrato para formar PG. Entre os prostanóides provenientes da COX encontrados em homogenatos de epiderme humana, a PGE<sub>2</sub> é o principal, sendo que a enzima PGE sintase cataliza o rearranjo de PGH<sub>2</sub> em PGE<sub>2</sub>. Na pele humana, na epiderme de camundongos, em culturas de queratinócitos de camundongos neonatos e na pele de ratos, além de PGE<sub>2</sub> é também encontrada PGD<sub>2</sub> (ORIDO et al., 2008; KABASHIMA e MIYACHI, 2004). Na membrana de células epidérmicas da pele humana, a presença de sítios de ligação específicos e de alta afinidade para PGE<sub>2</sub> é claramente verificada. No que diz respeito aos receptores de PGE<sub>2</sub>, os queratinócitos humanos expressam mRNA para três subtipos: EP2, EP3 e em menor quantidade EP4, todos associados a cascata de sinalização do 3', 5' - adenosina monofosfato cíclico (AMPC). Entretanto, o papel dos prostanóides nos queratinócitos está mais relacionado ao crescimento celular, do que a modulação de respostas imunes (KABASHIMA e MIYACHI, 2004). Ao atuar nesses receptores, a PGE<sub>2</sub> modula diversas ações de componentes celulares da pele, como supressão da proliferação de células T, facilitação da diferenciação de anticorpos para o isotipo IgE em células B, facilitação da degranulação e produção de IL-6 em mastócitos derivados da medula óssea, através da inibição da adenilato ciclase e aumento do Ca<sup>+2</sup> intracelular. Nos eosinófilos humanos a PGE<sub>2</sub> age prolongando a sobrevivência dessas células e em neutrófilos promove a supressão da expressão de TNF-α e o aumento da expressão de IL-6 (KABASHIMA e MIYACHI, 2004).

A aplicação tópica de AA tem sido descrita como causadora de inflamação cutânea em modelos animais de edema de orelha em camundongos. Esse procedimento promove aumento da permeabilidade vascular resultando em formação de edema e ainda, é verificada a indução da síntese de PGE<sub>2</sub> e dos leucotrienos C<sub>4</sub> e D<sub>4</sub> (EPPLER et al., 2007; OPAS et al., 1985). Uma vez que os metabólitos do AA incluindo hidroperóxidos lipídicos, prostaglandinas e leucotrienos estão intensamente envolvidos no processo inflamatório, espera-se que os inibidores da cascata do AA sejam agentes



antiinflamatórios efetivos, podendo ser possível sua aplicação para prevenção das complicações de doenças de pele com componente inflamatório. Os AINEs exercem seus efeitos principalmente por inibirem a atividade da COX, promovendo a diminuição da síntese de todos os prostanóides, inclusive PGE<sub>2</sub> (NAKAMURA et al., 2003; ORIDO et al., 2008).

A resposta inflamatória produzida pela aplicação de TPA possui mecanismos que parecem diferir dos mecanismos envolvidos na resposta desencadeada pela aplicação de AA. Uma dessas diferenças fica evidenciada ao verificar que inibidores da PLA<sub>2</sub> não interferem na resposta inflamatória do AA, enquanto que apresentam pronunciado efeito antiinflamatório no modelo induzido por TPA (GABOR, 2000; OTUKI et al., 2005). Sendo assim, os resultados obtidos com o EE da *C. leprosum* no modelo de AA indicam que um dos seus mecanismos como antiinflamatório tópico deve envolver inibição na via do AA, pois foi capaz de inibir a formação de edema nos dois modelos. Esse mecanismo poderá ser analisado melhor através de dosagem de mediadores e verificação da ação direta do extrato sobre as enzimas envolvidas na cascata.

Com o intuito de verificar a capacidade antiinflamatória do extrato frente a diferentes agentes flogísticos, foi utilizado o modelo de edema de orelha induzido por fenol. A dermatite induzida por fenol é um modelo animal que produz irritação imediata da pele e é utilizado para mimetizar a dermatite de contato promovendo irritação imediata na pele, com formação de edema massivo (LIM et al., 2004). A exposição da pele ao fenol e compostos fenólicos afeta uma parcela da população no mundo inteiro, sendo que a maior via de exposição é o contato com a pele que ocorre principalmente na indústria durante a produção de resinas, tintas, cosméticos e produtos farmacêuticos. Esse contato com a pele resulta, na maioria das vezes, em queimaduras, ulcerações, inflamação, necrose e dermatite de contato irritativa e alérgica, e ainda acredita-se que a ação dos compostos fenólicos na pele auxilie na promoção de câncer (MURRAY et al., 2007).

A resposta irritativa induzida por fenol parece ser resultante de diversos mecanismos, sendo que entre eles parecem estar a interrupção da membrana celular dos queratinócitos levando a liberação de mediadores pré-formados como IL-1 $\alpha$ , metabólitos do AA e espécies reativas de oxigênio (ROS) e ainda a

lesão ou estimulação direta de outros tipos celulares residentes na pele, como células dendríticas, fibroblastos e células endoteliais (WILMER et al., 1994). Muitos dos efeitos tóxicos desencadeados pela aplicação de fenol são devido a oxidação do fenol ou compostos fenólicos por enzimas como peroxidases, prostaglandinas sintases e tirosinases, que irão dar origem a radicais fenoxil. Esses radicais são então reduzidos por tiois para regenerar os compostos fenólicos e assim está formado um ciclo redox que cada vez mais produz radicais livres. Os radicais livres formados nesse ciclo diminuem a capacidade antioxidante da pele induzindo o estabelecimento de estresse oxidativo, o que pode levar a danos em proteínas, DNA e lipídios (LIM et al., 2004; MURRAY et al., 2007). A geração de radicais livres pode ser um importante contribuinte para a toxicidade dérmica dos compostos fenólicos, uma vez que a presença de ROS causa um aumento na produção e liberação de vários mediadores pró-inflamatórios como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , LTs e PGs, os quais provavelmente são responsáveis pela resposta inflamatória que se segue a exposição ao fenol, já que esses mediadores amplificam a resposta inflamatória estimulando outras citocinas e mediadores (MURRAY et al., 2007).

Trabalhos demonstram que os mecanismos envolvidos no processo inflamatório induzido por fenol são provavelmente, diferentes daqueles envolvidos na reação ao TPA, uma vez que compostos capazes de inibir a resposta gerada pela aplicação do TPA demonstraram fraca atividade contra a irritação gerada por fenol (LIM et al., 2004). O EE foi capaz de reverter o edema induzido pela aplicação de fenol, o que sugere que esse extrato provavelmente possua atividade contra a dermatite de contato desencadeada por agentes irritantes. Além disso, este resultado confirma que o extrato atua provavelmente por mais de um mecanismo, visto que foi tão efetivo contra a resposta desencadeada pelo fenol, quanto contra a resposta desencadeada pelo TPA.

Conforme verificado anteriormente, ao ser realizada a avaliação curso temporal do comportamento do extrato, este demonstrou-se efetivo mesmo quando administrado após o estabelecimento do processo inflamatório, o que sugere que o extrato seria capaz de agir contra uma situação de inflamação crônica. Sendo assim, tornou-se interessante verificar a real capacidade do EE em reverter processos crônicos utilizando um modelo animal mais adequado,

que no caso foi o edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton.

A múltipla aplicação tópica de TPA (princípio ativo do OC) nas orelhas de camundongos produz uma reação inflamatória prolongada caracterizada pelo aumento do peso das orelhas, infiltração de células inflamatórias e hiperplasia epidermal. Esse modelo de inflamação cutânea crônica permite a identificação de compostos que são capazes de inibir o processo inflamatório já instalado ou crônico. Assim, esse modelo parece ser mais relevante na avaliação de componentes com atividade antiinflamatória do que o modelo de inflamação aguda induzida por TPA, já que no modelo crônico os componentes são administrados após o estabelecimento da lesão, o que se assemelha ao que ocorre na clínica com o uso de drogas antiinflamatórias (STANLEY et al., 1991).

Conforme descrito anteriormente, os ésteres de forbol presentes no OC são conhecidos por promoverem uma rápida e intensa resposta inflamatória que é desencadeada principalmente pela ativação da PKC, que por sua vez ativa diversas vias, gerando aumento da permeabilidade vascular, liberação de AA e consequente síntese de seus metabólitos como PGs e LTs e ao aumento da expressão moléculas como COX, IL-1, TNF- $\alpha$  e moléculas de adesão (BRALLEY et al., 2007; GARBOR, 2000). Assim, a aplicação repetida do OC promove a instalação de uma resposta inflamatória persistente que é caracterizada pelo aumento no peso das orelhas, intensa infiltração celular, mas principalmente por uma hiperproliferação epidérmica (aumento na espessura da epiderme com desenvolvimento de acantose), parâmetros similares aos que ocorrem em algumas doenças inflamatórias crônicas de pele como a psoríase (STANLEY et al., 1991; LEE et al., 2009).

O processo inflamatório surge como parte de um processo fisiológico de reparação. Contudo, se este processo não for estreitamente controlado, a reação inicialmente benéfica pode se alastrar, perdendo sua função reparadora e podendo gerar danos (ALLER et al., 2006). Se uma reação inflamatória aguda falha na erradicação do estímulo, ou se uma resposta imune adaptativa é ativada por um estímulo persistente, o processo inflamatório persiste e evolui para uma forma crônica, na qual células efetoras especializadas do sistema imune são envolvidas. Além disso, o infiltrado leucocitário sofre mudanças e o

intenso influxo de neutrófilos é substituído por uma mistura de componentes celulares que inclui fagócitos mononucleares e células T (POBER e SESSA, 2007). No modelo de inflamação crônica induzida pela aplicação múltipla de TPA o pico de migração de leucócitos polimorfonucleares para o local inflamado é observado no terceiro dia, sendo que já no quarto dia o perfil leucocitário se altera com o aumento no número de macrófagos e esse aumento se intensifica atingindo seu ápice no décimo dia (ALFORD et al., 1992).

Assim, quando o processo torna-se crônico o principal tipo celular observado no infiltrado são células mononucleares as quais podem ser avaliadas através da medida da atividade da enzima NAG. NAG é uma enzima lisossomal que é produzida por monócitos ativados, principalmente macrófagos. A medida de sua atividade é considerada um indicador indireto da presença de células mononucleares no foco inflamatório (BAILEY, 1988). Entre as células mononucleares presentes no foco inflamatório destacam-se mastócitos e macrófagos, que uma vez ativados, sofrem degranulação promovendo a liberação de uma bateria de mediadores inflamatórios, incluindo aminas bioativas (histamina, serotonina), citocinas, quimiocinas assim como mediadores lipídicos. Esses mediadores promoverão o recrutamento e a ativação de outras células inflamatórias, o que leva a sustentação do processo (LAWRENCE e GILROY, 2007).

Portanto, ao inibir a migração de células mononucleares o extrato pode contribuir para o alívio de sintomas desencadeados pelas células inflamatórias e mediadores, um mecanismo bastante importante na resolução de doenças inflamatórias crônicas. O EE foi capaz de inibir a migração celular de maneira bastante significativa conforme observado na análise histológica. As avaliações das atividades enzimáticas de NAG e MPO demonstraram que o EE atuou principalmente na inibição do influxo de mononucleares uma vez que este foi efetivo apenas inibindo a atividade da NAG. Ao contrário do observado no modelo de inflamação aguda, no processo crônico o extrato não foi capaz de inibir significativamente a infiltração de neutrófilos. Entretanto, como o extrato foi bastante efetivo ao inibir a atividade da MPO no modelo agudo inclusive inibindo a atividade da enzima *in vitro*, a falta de atividade inibitória observada no modelo de inflamação crônica, se deve provavelmente ao fato de que na

fase crônica do processo inflamatório o número de células PMN é reduzido, o que dificulta a análise da possível influência de compostos sobre essas células.

Conforme observado anteriormente, o extrato demonstrou capacidade em influenciar diretamente a atividade da enzima MPO, suscitando assim o interesse em verificar se o mesmo poderia estar ocorrendo com a enzima NAG. Semelhante ao que foi observado com a MPO, o EE da *C. leprosum* também foi capaz de inibir a atividade da NAG diretamente.

A hiperproliferação epidérmica é outra característica do modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla do OC e que está diretamente relacionada com doenças de pele como a psoríase. A estrutura e função da epiderme dependem do balanço bem controlado entre a proliferação e a diferenciação de queratinócitos. Esse balanço é interrompido em doenças dermatológicas hiperproliferativas como a psoríase, onde se observa um intenso crescimento epidermal, semelhante ao processo regenerativo observado em processo de cicatrização. O controle do crescimento dos queratinócitos é mediado por uma variedade de fatores de crescimento incluindo o fator de crescimento de queratinócitos (KGF) e o TGF-  $\alpha$ , os quais estimulam a proliferação celular basal (ALBANESI et al., 2007).

Apesar de ainda existirem controvérsias, o início e a manutenção do processo de hiperproliferação observado na psoríase, se deve primeiramente a infiltração de células T. Principalmente essas células, mas também outros componentes inflamatórios como células dendríticas, macrófagos e neutrófilos promovem a liberação de citocinas, as quais levariam a hiperproliferação. Algumas citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6 e Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), são conhecidas como indutores diretos da hiperplasia epidermal. Além disso, as células T parecem estar envolvidas na interrupção da membrana basal da epiderme. Nas análises imunohistoquímicas de pele psoriática é comum a presença de lacunas entre os queratinócitos com ausência de colágeno, laminina e desmossomos. Tanto a presença de citocinas como as falhas na membrana basal podem ser interpretadas pelos queratinócitos como sendo uma lesão e induzir a um processo de reparação, liberando citocinas mitogênicas que levarão ao crescimento epidermal. Portanto, as células inflamatórias, principalmente os linfócitos T desencadeiam e mantém a

hiperplasia crônica ao liberar citocinas pro-inflamatórias e ao quebrar a integridade epidermal (TONEL e CONRAD, 2008).

Estudos analisando diferentes marcadores de diferenciação e do ciclo celular demonstraram um aumento no número de integrinas, queratina e PCNA nos queratinócitos de tecidos psoriáticos (ALBANESI et al., 2007). Neste trabalho, através da análise imunohistoquímica foi possível verificar que o extrato aplicado topicamente no modelo de inflamação crônica, diminuiu o aumento da expressão de PCNA na camada basal da epiderme causado pela aplicação repetida de OC, indicando inibição do aumento da proliferação epidérmica.

A inflamação cutânea é uma importante característica da psoríase a qual é caracterizada imunologicamente pela migração e acúmulo de neutrófilos e células mononucleares na epiderme e por secreção de citocinas por células inflamatórias, principalmente TNF- $\alpha$  (MAN et al., 2008; JACOBI et al., 2006). Na psoríase ocorre marcante espessamento da epiderme, devido ao aumento da proliferação de queratinócitos. A epiderme torna-se alongada e forma invaginações para a derme. Além disso, há uma acentuada infiltração de leucócitos mononucleares na derme os quais podem advir da penetração do parênquima cutâneo através da transmigração de vasos ativos ou ainda os leucócitos residentes podem se expandir e criar um denso infiltrado observado em lesões psoriáticas (LOWES et al., 2007).

A maioria das desordens cutâneas são tratadas adequadamente e com sucesso, entretanto o mesmo não ocorre com doenças inflamatórias crônicas, como psoríase e dermatite atópica, em parte porque suas origens etiológicas são na maioria das vezes complexas e o processo patológico não é bem definido. Diversas abordagens têm sido consideradas e utilizadas na tentativa de conter essas desordens, mas até o momento nenhum tratamento totalmente satisfatório foi encontrado (CHI et al., 2003).

No modelo de aplicação crônica de óleo de cróton, EE foi capaz de reduzir todos os parâmetros inflamatórios avaliados, edema, migração celular e hiperproliferação epidérmica. Embora o modelo utilizado não seja um análogo exato da psoríase, ele apresenta algumas características como hiperplasia epidermal que permite o acesso a potenciais tratamentos para a psoríase, uma

vez que as substâncias testadas sejam capazes de reduzir ou eliminar o aparecimento desses parâmetros inflamatórios.

Para a maioria das doenças de pele, incluindo a psoríase, a principal terapia é a aplicação tópica de corticóides, e essas drogas tem sido a primeira escolha no tratamento de doenças de pele como eczema, dermatite atópica e seborreica e psoríase (CALOU et al., 2008; LAM et al., 2008). Os glicocorticóides são extensamente utilizados para suprimir o processo inflamatório em doenças inflamatórias crônicas as quais são associadas como aumento da expressão de genes inflamatórios. O principal efeito dos glicocorticóides é inibir a expressão de uma série de genes inflamatórios incluindo genes de citocinas, enzimas, receptores e moléculas de adesão. Para tanto, se ligam em receptores próprios que são do tipo nuclear e essa ação inibitória envolva além dos receptores, fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B e AP-1, sendo que estes regulam a expressão gênica de diversos componentes inflamatórios (BARNES, 1998; CHI et al., 2003) .

Nossos resultados demonstram que tanto o extrato etanólico quanto o triterpeno isolado possuem eficácia comparável a da dexametasona na reversão do processo inflamatório. Tamanha eficácia não é comumente encontrada entre outros compostos estudados, especialmente quando estes são derivados de plantas. A dexametasona é um glicocorticóide muito potente sendo seu uso clínico, quando possível, substituído por corticóides mais fracos, que possam gerar menores efeitos colaterais. Em doenças cutâneas a dexametasona só é empregada em condições onde outras drogas não sejam eficazes como em casos de psoríase grave, dermatite seborreica grave e dermatite bolhosa herpetiforme (FFUP, 2006).

Uma vez que os compostos foram bastante eficazes, tornou-se interessante investigar se o extrato não estaria atuando pela mesma via que os corticóides, o que poderia justificar tamanha eficácia. Para tanto, foi realizada a co-administração de baixas doses do EE e da dexametasona a fim de verificar uma possível interação sinérgica. Quando dois compostos são associados pode ocorrer um efeito aditivo uma vez que os compostos atuem pela mesma via, ou um efeito potenciado quando atuam em receptores farmacológicos diferentes (SECOLI, 2001). A associação do EE com a dexametasona promoveu um pequeno aumento da inibição do edema quando comparada com

a atividade dos compostos administrados isoladamente, indicando apenas um efeito aditivo. Como não houve potencialização do efeito, existe a possibilidade de que algum composto presente no EE esteja atuando pela mesma via que os corticóides. Entretanto, é necessária a comprovação desse efeito através de técnicas específicas, como por exemplo, o bloqueio dos receptores corticóides com antagonistas.

Juntos, os resultados obtidos nesse estudo sugerem que *C. leprosum* possui atividade antiinflamatória tópica eficiente, o que poderia permitir o emprego dessa planta na indústria cosmética para o tratamento de diversas situações dermatológicas. Uma vez que a população brasileira utiliza *C. leprosum* também no tratamento tópico de feridas e picadas de cobra, esses estudos preliminares, utilizando modelos de animais *in vivo*, sustentam o uso popular e sugerem uma nova aplicação clínica.

Embora o mecanismo molecular pelo qual o extrato e o TTHL agem ainda não esteja elucidado, ambos foram capazes de reverter o processo inflamatório de maneira bastante significativa, além disso, o TTHL também inibiu o processo proliferativo na pele. Sendo assim, estes poderiam ser considerados uma nova ferramenta em potencial para o tratamento de várias doenças inflamatórias de pele como psoríase. Entretanto, se faz necessária a continuação das investigações acerca dos efeitos dessa planta para demonstrar sua efetividade e descartar possível toxicidade.



## **CONCLUSÕES**

---

## 6. CONCLUSÕES

- O extrato etanólico das flores de *C. leprosum*, assim como o TTHL, apresentaram atividade antiedematogênica no modelo de inflamação cutânea induzida pela aplicação tópica de TPA;
- O extrato etanólico das flores de *C. leprosum*, assim como o TTHL, diminuíram o influxo celular para o local inflamado conforme demonstrado pela inibição do aumento da atividade da enzima MPO, no modelo de edema de orelha induzido por TPA, indicando possível influência sobre a migração celular o que foi comprovado com a análise histológica;
- O extrato etanólico das flores de *C. leprosum* também apresentou atividade antiedematogênica no edema de orelha induzido por AA e fenol, sugerindo influência sobre os metabólitos do AA e uma possível atividade no tratamento de dermatite de contato irritativa;
- O extrato etanólico das flores de *C. leprosum* foi ainda capaz de inibir diversos parâmetros inflamatórios no modelo de inflamação crônica, como migração de mononucleares, formação de edema e hiperproliferação epidérmica.

Os resultados demonstram que *C. leprosum* apresenta atividade antiinflamatória tópica, quando testada em diferentes modelos de inflamação em camundongos. Os mecanismos pelos quais os compostos agem ainda permanecem incertos, mas como o extrato foi eficaz em diferentes modelos, provavelmente este possua compostos que estejam atuando por diferentes vias inflamatórias. Portanto, é necessária a complementação do estudo com a investigação dos demais compostos isolados do extrato e de seus mecanismos de ação, bem como do triterpeno TTHL. Apesar de ainda incompletos, esses resultados servem como informações científicas que suportam a validação do uso popular de *C. leprosum* e abre uma nova perspectiva para estudo e desenvolvimento de um novo antiinflamatório para uso tópico, o TTHL.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M.F.; BARACHO, G.S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I.J.; COELHO, V.P. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 383-95, 2007.

ALBANESI, C.; DE PITÀ, O.; GIROLOMONI, G. Resident skin cells in psoriasis: a special look at the pathogenetic functions of keratinocytes. **Clinical Dermatology**. v. 25, p. 581-588, 2007.

ALFORD, J.G.; STANLEY, G.; TODDERUD, G.; TRAMPOSCH, K.M. Temporal infiltration of leukocyte subsets into mouse skin inflamed with phorbol ester. **Agents and Actions**, v. 37, p. 260-267, 1992.

ALLER, M.A.; ARIAS, J.L.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response: an efficient way of life. **Medical Science Monitor**, v. 12, p. 225-234, 2006.

ALMEIDA, F.R.C.; SILVA, A.M.O.; SILVA, L.L.; ALENCAR, N.L.; REIS, J.C.; LIRA, S.R.S. Estudo dos efeitos ansiolítico e relaxante muscular de *Combretum leprosum* MART. & EICHER. **XXXV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, v. 1, p. 191, 2003.

AMIGÓ, M.; PAYÁ, M.; DE ROSA, S.; TERCENIO, M.C. Antipsoriatic effects of avarol-3'-thiosalicylate are mediated by inhibition of TNF-alpha generation and NF-kappaB activation in mouse skin. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, p. 353-365, 2007.

ANGEH, J.E.; HUANG, X.; SATTTLER, I.; SWAN, G.E.; DAHSE, H.; HÄRTL, A.; ELOFF, J.N. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of four known and one new triterpenoid from *Combretum imberbe* (Combretaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 56-60, 2007.

ARATANI, Y.; KOYAMA, H.; NYUI, S.; SUZUKI, K.; KURA, F.; MAEDA, N. Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 1828-1836, 1999.

BAILEY, P.J. Sponge implants as models. **Methodology in immunology**, v. 162, p. 327-334, 1988.

BARNES, P.J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. **Clinical Science**, v. 94, p. 557-572, 1998.

BENNETT, M.F.; ROBINSON, M.K.; BARON, E.D.; COOPER, K.D. Skin immune systems and inflammation: protector of the skin or promoter of aging? **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 13, p. 15-19, 2008.

BHoola, K.D.; FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacological Reviews**, v. 44, p. 1-80, 1992.

BRADLEY, P.P., PRIEBAT, D.A., CHRISTENSEN, R.D., ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal Investigative of Dermatology**. v. 78, p. 206-209, 1982.

BRALLEY, E.E.; HARGROVE, J.L.; GREENSPAN, P.; HARTLE, D.K. Topical anti-inflammatory activities of *Vitis rotundifolia* (muscadine grape) extracts in the tetradecanoylphorbol acetate model of ear inflammation. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, p. 636-642, 2007.

BUCKLE, D.R.E.; HEDGECOCK, C.J.R. Drug targets in inflammation and immunomodulation. **Drug Discovery Today**, v. 2, p. 235-332, 1997.

CALIXTO, J.B.; CABRINI, D.A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, v. 87, p. 1-5, 2000.

CALIXTO, J.B.; CAMPOS, M.M.; OTUKI, M.F.; SANTOS, A.R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Medica**, v. 70, p. 93-103, 2004.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-4, 2005.

CALOU, I.B.; SOUSA, D.I.; CUNHA, G.M.; BRITO, G.A.; SILVEIRA, E.R.; RAO, V.S.; SANTOS, F.A. Topically applied diterpenoids from *Egletes viscosa* (Asteraceae) attenuate the dermal inflammation in mouse ear induced by tetradecanoylphorbol 13-acetate- and oxazolone. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, V. 31, P. 1511-15166, 2008.

CEEA, 2003. **Comissão de ética em experimentação animal da Universidade Federal do Paraná**. Disponível em: <http://www.bio.ufpr.br/ceea/html/index.html>. Acesso em: 10 Abril, 2007.

CHI, Y.S.; LIM, H.; PARK, H.; KIM, H.P. Effects of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*, on skin inflammation: in vivo regulation of inflammation-associated gene expression. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1271-1278, 2003.

CHAVES, E.M.F.; BARROS, R.F.M.; ARAÚJO, F.S. Flora Apícola do Carrasco no Município de Cocal, Piauí, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 555-557, 2007.

CNIP/APNE, 2008. **Mofumbo**. Disponível em: [http://www.cnip.org.br/banco\\_img/Mofumbo/index.html](http://www.cnip.org.br/banco_img/Mofumbo/index.html). Acesso em: 11 agosto, 2008.

COUTANT, K.D.; RYDER, N.S. Bradykinin upregulates immediate-early gene mRNA in human keratinocytes. **Archives of Dermatological Research**, v. 288, p. 2-6, 1996.

CRUMMEY, A.; HARPER, G.P.; BOYLE, E.A.; MANGAN, F.R. Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing topical anti-inflammatory compounds. **Agents and Actions**, v. 20, p. 69-76, 1987.

DEBENEDICTIS, C.; JOUBEH, S.; ZHANG, G.; BARRIA, M.; GHOHESTANI, R.F. Immune functions of the skin. **Clinical Dermatology**, v. 19, p. 573-85, 2001.

DENNING, M.F. Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 1141-1146, 2004.

DE VRY, C.G.; VALDEZ, M.; LAZAROV, M.; MUHR, E.; BUELOW, R.; FONG, T.; IYER, S. Topical application of a novel immunomodulatory peptide, RDP58, reduces skin inflammation in the phorbol ester-induced dermatitis model. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 125, p. 473-481, 2005.

DE YOUNG, L.M.; KHEIFETS, J.B.; BALLARON, S.J.; YOUNG, J.M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents & Actions**, v. 26, p. 335-341, 1989.

ELDEEN, I.M.; ELGORASHI, E.E.; VAN STADEN, J. Antibacterial, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and mutagenic effects of extracts obtained from some trees used in South African traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 457-464, 2005.

EPPLER, A.R.; KRAELING, M.E.; WICKETT, R.R.; BRONAUGH, R.L. Assessment of skin absorption and irritation potential of arachidonic acid and glyceryl arachidonate using in vitro diffusion cell techniques. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 2109-2117, 2007.

FACUNDO, V.A.; ANDRADE, C.H.S.; SILVEIRA, E.R.; BRAZ-FILHO, R.; HUFORD, C.D. Triterpenes and flavonoids from *C. leprosum*. **Phytochemistry**, v. 32, p. 411–415, 1993.

FACUNDO, V.A.; RIOS, K.A.; MEDEIROS, C.M.; MILITÃO, J.S.L.T.; MIRANDA, A.L.P.; EPIFANIO, R.A.; CARVALHO, M.P.; ANDRADE, A.T.; PINTO, A.C.; REZENDE, C.M. Arjunolic acid in the ethanolic extract of *Combretum leprosum* root and its use as a potential multi-functional phytomedicine and drug for neurodegenerative disorders: anti-inflammatory and anticholinesterasic activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1309-1312, 2005.

FERNANDES, F.F.A.; EL-KIK, C.; FACUNDO, V.A.; MELO, P.A. Evaluation Of Antiofidic Activity Of *Combretum Leprosum* Mart Fruit Extract. **XXXIX Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, p. 09.089, 2007.

FFUP, 2006. **Dexametasona**. Disponível em: <<http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0607/dexametasona/index.html>>. Acesso em: 20 dezembro, 2008.

FREINKEL, R.K.; WOODLEY, D.T. **The Biology of the Skin**. 1 ed. New York: The Parthenon Publishing Group, 2001

FYHRQUIST, P. Traditional medicinal uses and biological activities of some plant extracts of African *Combretum* Loefl., *Terminalia* L. and *Pteleopsis* Engl. Species (Combretaceae). **Dissertação Acadêmica**. Universidade de Helsinki, Helsinki, 2007.



GÀBOR, M. **Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 2000.

GARG, R.; RAMCHANDANI, A.G.; MARU, G.B. Curcumin decreases 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced protein kinase C translocation to modulate downstream targets in mouse skin. **Carcinogenesis**, v. 29, p. 1249-1257, 2008.

GARRIDO, G.; GONZÁLEZ, D.; LEMUS, Y.; GARCÍA, D.; LODEIRO, L.; QUINTERO, G.; DELPORTE, C.; NÚÑEZ-SELLÉS, A.J.; DELGADO, R. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG). **Pharmacological Research**, v. 50, p. 143-149, 2004.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de Histología**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p 253–259, 1999.

GNIADECKI, R. Regulation of keratinocyte proliferation. **General Pharmacology**, v. 30, p. 619-622, 1998.

GOLENIOWSKI, M.E.; BONGIOVANNI, G.A.; PALACIO, L.; NUÑEZ, C.O.; CANTERO, J.J. Medicinal plants from the "Sierra de Comechingones", Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 324-341, 2006.

GUILPAIN, P.; SERVETTAZ, A.; BATTEUX, F.; GUILLEVIN, L.; MOUTHON, L. Natural and disease associated anti-myeloperoxidase (MPO) autoantibodies. **Autoimmunity Reviews**, v. 7, p. 421-425, 2008.

HUMES, J.L.; OPAS, E.E.; BONNEY, R.J. Arachidonic acid metabolites in mouse ear oedema. LEWIS, A. e CAPETOLA, R. In: **Advances in Inflammations Research I**. New York: Raven Press, p. 57-65, 1986.

ITOKAWA, H.; MORRIS-NATSCHKE, S.L.; AKIYAMA, T.; LEE, K.H. Plant-derived natural product research aimed at new drug discovery. **Nature Medicine**, v. 62, p. 263-280, 2008.

JACOBI, A.; MAHLER, V.; SCHULER, G.; HERTL, M. Treatment of inflammatory dermatoses by tumour necrosis factor antagonists. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 20, p. 1171-1187, 2006.

KABASHIMA, K.; MIYACHI, Y. Prostanoids in the cutaneous immune response. **Journal of Dermatological Science**, v. 34, p. 177-184, 2004.

KOLEWE, M.E.; GAURAV, V.; ROBERTS, S.C. Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. **Molecular Pharmacology**, v. 5, p. 243-256, 2008.

KUMAR, B.; VIJAYAKUMAR, M.; GOVINDARAJAN, R.; PUSHPANGADAN, P. Ethnopharmacological approaches to wound healing--exploring medicinal plants of India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 103-113, 2007.

KUNDU, J.K.; HWANG, D.M.; LEE, J.C.; CHANG, E.J.; SHIN, Y.K.; FUJII, H.; SUN, B.; SURH, Y.J. Inhibitory effects of oligonol on phorbol ester-induced tumor promotion and COX-2 expression in mouse skin: NF-kappaB and C/EBP as potential targets. **Cancer Letters**, v. 273, p. 86-97, 2009.

LAM, J. ; POLIFKA, J.E. ; DOHIL, M.A. Safety of dermatologic drugs used in pregnant patients with psoriasis and other inflammatory skin diseases. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 59, p. 295-315, 2008.

LAWRENCE, T.; GILROY, D.W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **International Journal of Experimental Pathology**, v. 88, p. 85-94, 2007.

LEE do, Y.; CHOO, B.K.; YOON, T.; CHEON, M.S.; LEE, H.W.; LEE, A.Y.; KIM, H.K. Anti-inflammatory effects of *Asparagus cochinchinensis* extract in acute and chronic cutaneous inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, p. 28-34, 2009.

LENTINI, F. The role of ethnobotanics in scientific research. State of ethnobotanical knowledge in Sicily. **Fitoterapia**, v. 71 (suppl 1), p. 83-88, 2000.

LIM, H.; PARK, H.; KIM, H.P. Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of proinflammatory gene expression by topically applied flavonoid, wogonin. **Archives of Pharmacal Research**. v. 27, p. 442-448, 2004.

LOWES, M.A.; BOWCOCK. A.M.; KRUEGER, J.G. Pathogenesis and therapy of psoriasis. **Nature**, v. 445, p. 866-873, 2007.

MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULIS, C.C. The skin as a mirror of the aging process in the human organism - State of the art and results of the aging research in the German National Genome Research Network 2 (NGFN-2). **Experimental Gerontology**, v. 42, p. 879-886, 2007.

MALLE, E.; FURTMÜLLER, P.G.; SATTLER, W.; OBINGER, C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? **British Journal of Pharmacology**, v. 152, p. 838-854, 2007.

MAN, M.Q.; SHI, Y.; MAN, M.; LEE, S.H.; DEMERJIAN, M.; CHANG, S.; FEINGOLD, K.R.; ELIAS, P.M. Chinese herbal medicine (Tuhuai extract) exhibits topical anti-proliferative and anti-inflammatory activity in murine disease models. **Experimental Dermatology**, v. 17, p. 681–687, 2008.

MARINHO, I.V.; FREITAS, M.F.; ZANELLA, F.C.V.; CALDAS, A.L. Espécies vegetais da caatinga utilizadas pelas abelhas indígenas sem

ferrão como fonte de recursos e local de nidificação. **I Congresso Brasileiro de Extensão Universitária**. João Pessoa, 2002.

MCGAW, L.J.; RABE, T.; SPARG, S.G.; JÄGER, A.K.; ELOFF, J.N.; VAN STADEN, J. An investigation on the biological activity of *Combretum* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 45-50, 2001.

MEDEIROS, C.M.; CARVALHO, A.T.; FACUNDO, V.A.; REZENDE, C.M.; PINTO, A.C.; MIRANDA, A.L.P. Atividade analgésica e antiinflamatória do extrato etanólico da raiz de *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae) (06.032). **XXXV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, v. 1. p. 134, 2003.

MEDEIROS, R.; OTUKI, M.F.; AVELLAR, M.C.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene alpha-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **European Journal of Pharmacology**, v. 559, p. 227-235, 2007.

MENESES, A.D.; AMARAL, E.J.R.; CRUZ, F.J.S.M.; SILVÉRIA, R.S.L.; ALMEIDA, F.R.C.; BRITO, S.M.R.C.; CAVALCANTI, P.M.S; NUNES P.H.M. Atividade antiulcerogênica de *Combretum leprosum* MART & EICHE. **XXXV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, v. 1. p. 193, 2003.

MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y.; FUKUDA, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)-alpha in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 1331-1336, 2006.

MURRAY, A.R.; KISIN, E.; CASTRANOVA, V.; KOMMINENI, C.; GUNTHER, M.R.; SHVEDOVA, A.A. Phenol-induced in vivo oxidative stress in skin: evidence for enhanced free radical generation, thiol

oxidation, and antioxidant depletion. **Chemical Research in Toxicology**, v. 20, p. 1769-1777, 2007.

NAKAMURA, Y.; KOZUKA, M.; NANIWA, K.; TAKABAYASHI, S.; TORIKAI, K.; HAYASHI, R.; SATO, T.; OHIGASHI, H.; OSAWA, T. Arachidonic acid cascade inhibitors modulate phorbol ester-induced oxidative stress in female ICR mouse skin: differential roles of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in leukocyte infiltration and activation. **Free Radical Biology & Medicine** , v. 35, p. 997-1007, 2003.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, p. 846-852, 2002.

OJEWOLE, J.A. Cardiovascular effects of mollic acid glucoside, a 1 $\alpha$ -hydroxycycloartenoid saponin extractive from *Combretum molle* R Br ex G Don (Combretaceae) leaf. **Cardiovascular Journal of Africa**, v. 19, p. 128-134, 2008a.

OJEWOLE, J.A. Analgesic and antiinflammatory effects of mollic acid glucoside, a 1  $\alpha$ -hydroxycycloartenoid saponin extractive from *Combretum molle* R. Br. ex G. Don (Combretaceae) leaf. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 30-35, 2008b.

OPAS, E.E.; BONNEY, R.J.; HUMES, J.L. Prostaglandin and leukotriene synthesis in mouse ears inflamed by arachidonic acid. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 84, p. 253-256, 1985.

ORIDO, T.; FUJINO, H.; HASEGAWA, Y.; TOYOMURA, K.; KAWASHIMA, T.; MURAYAMA, T. Indomethacin decreases arachidonic acid uptake in HCA-7 human colon cancer cells. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 108, p. 389-392, 2008.

OTUKI, M.F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium*

kleinii and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, v. 507, p. 253-259, 2005.

PARK, J.H.; LEE, C.K.; HWANG, Y.S.; PARK, K.K.; CHUNG, W.Y. Hemin inhibits cyclooxygenase-2 expression through nuclear factor-kappa B activation and ornithine decarboxylase expression in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-treated mouse skin. **Mutation Research**, v. 642, p. 68-73, 2008.

PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and pharmacognosy. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2960-2972, 2007.

PIETROVSKI, E.F.; ROSA, K.A.; FACUNDO, V.A.; RIOS, K.; MARQUES, M.C.; SANTOS, A.R. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3beta,6beta,16beta-trihydroxylup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 83, p. 90-99, 2006.

PIETROVSKI, E.F.; MAGINA, M.D.; GOMIG, F.; PIETROVSKI, C.F.; MICKE, G.A.; BARCELLOS, M.; PIZZOLATTI, M.G.; CABRINI, D.A.; BRIGHENTE, I.M.; OTUKI, M.F. Topical anti-inflammatory activity of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, p. 479-487, 2008.

PLAEGER, S.F. Clinical immunology and traditional herbal medicines. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, p. 337-338, 2003.

POBER, J.S.; SESSA, W. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 803-815, 2007.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J.M.; JENSEN, J.M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v. 17, p. 1063–1072, 2008.

RAHMAN, S.; BHATIA, K.; KHAN, A.Q.; KAUR, M.; AHMAD, F.; RASHID, H.; ATHAR, M.; ISLAM, F.; RAISUDDIN, S. Topically applied vitamin E prevents massive cutaneous inflammatory and oxidative stress responses induced by double application of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 172, p. 195-205, 2008.

RISHTON, G.M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. **American Journal of Cardiology**, v. 101, p. 43D-49D, 2008.

ROCHE, 2005. **A pele**. Disponível em: <[www.roche.pt/e-books/files/pdfs/dexpantenol3.pdf](http://www.roche.pt/e-books/files/pdfs/dexpantenol3.pdf)>. Acesso em: 20 novembro, 2008.

RODRIGUES SILVA, D.; BARONI, S.; SVIDZINSKI, A.E.; BERSANI-AMADO, C.A.; CORTEZ, D.A. Anti-inflammatory activity of the extract, fractions and amides from the leaves of *Piper ovatum* Vahl (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 569-573, 2008.

SAKLANI, A.; KUTTY, S.K. Plant-derived compounds in clinical trials. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 161-171, 2008.

SANCHEZ, T.; MORENO, J.J. Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, p. 877-879, 1999.

SCHÖN, M.P.; BOEHNCKE, W.H. Psoriasis. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 1899-1912, 2005.

SECOLI, S.R. Interações medicamentosas: fundamentos para a prática clínica da enfermagem. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v.35, p. 28-34, 2001.

SEELIGER, S.; DERIAN, C.K.; VERGNOLLE, N.; BUNNETT, N.W.; NAWROTH, R.; SCHMELZ, M.; VON DER WEID, P.Y.; BUDDENKOTTE, J.; SUNDERKÖTTER, C.; METZE, D.; ANDRADE-GORDON, P.; HARMS, E.; VESTWEBER, D.; LUGER, T.A.; STEINHOFF, M. Proinflammatory role of proteinase-activated receptor-2 in humans and mice during cutaneous inflammation in vivo. **The FASEB Journal**, v. 17, p. 1871-1885, 2003.

SMITH, C.J.; ZHANG, Y.; KOBOLDT, C.M.; MUHAMMAD, J.; ZWEIFEL, B.S.; SHAFFER, A.; TALLEY, J.J.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; ISAKSON, P.C. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. **Proceedings of the National Academy Sciences U S A**, v. 95, p. 13313-13318, 1998.

SORRELL, J.M.; CAPLAN, A.I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. **Journal of Cell Science**, v. 117, p. 667-675, 2004.

SPELLBERG, B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. **Life Sciences**, v. 67, p. 477-502, 2000.

STANLEY, P.L., STEINER, S., HAVENS, M., TRAMPOSH, K.M. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Skin Pharmacology**, v. 4, p. 262-271, 1991.

STEPP, J.R. The role of weeds as sources of pharmaceuticals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 163-166, 2004.

TONEL, G.; CONRAD, C. Interplay between keratinocytes and immune cells-Recent insights into psoriasis pathogenesis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 2008.

VAN DE KERKHOF, P.C.; SEGART, S.; LAHFA, M.; LUGER, T.A.; KAROLYI, Z.; KASZUBA, A.; LEIGHEB, G.; CAMACHO, F.M.; FORSEA,



D.; ZANG, C.; BOUSSUGE, M.P.; PAOLOZZI, L.; WAJDULA, J. Once weekly administration of etanercept 50 mg is efficacious and well tolerated in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis: a randomized controlled trial with open-label extension. **British Journal of Dermatology**, v. 159, p. 1177-1185, 2008.

WILLIAMS, I.R.; KUPPER, T.S. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. **Life Sciences**, v. 58, p. 1485-507, 1996.

WILLOUGHBY, D.A.; MOORE, A.R.; COLVILLE-NASH, P.R.; GILROY, D. Resolution of inflammation. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 22, p. 1131-1135, 2000.

WILMER, J.L.; BURLESON, F.G.; KAYAMA, F.; KAUNO, J.; LUSTER, M.I. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical – induced inflammation in mouse skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, p. 915-922, 1994.

YESILADA, E. Past and future contributions to traditional medicine in the health care system of the Middle-East. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p. 135-7, 2005.

YOUNG, J.M., SPIRES, D.A., BEDORD, C.J., WAGNER, B., BALLRON, S.J., DE YOUNG, L.M. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 82, p. 367-371, 1984.